MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

RAPPORT D'ACTIVITES

DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX

ANNEE 2014

RA / CBS. 2014

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	2
Service d'Analyse	3
Pépinière d'entreprises du Centre de Biotechnologie de Sfax	7
Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR)	9
Unité d'Information et de Documentation Scientifique	17
Membres du Conseil Scientifique	19
Budget du CBS	20
Effectif du CBS	20
Liste des Enseignants Chercheurs / Ingénieurs du CBS	20
Coopération Internationale en cours	22
Ouverture sur l'environnement au cours de 2014	23
Equipements Lourds du CBS	28
Production Scientifique	29
Les journées scientifiques	29
Laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production de Protéines chez les Eucaryotes (LVBPPE)	30
Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)	59
Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes (LPAP)	89
Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB)	143

Introduction :

Le Centre de Biotechnologie de Sfax est composé de Quatre laboratoires de recherche, une administration (ressources humaines, finance), des services communs (informatique et logistique, analyse et maintenance.), une unité spécialisée (valorisation des résultats de la recherche, information) et des structures d'accompagnement dont principalement une pépinière d'entreprise rattachée au Centre de Biotechnologie de Sfax, une cellule de relations extérieures et un Bureau de Transfert de Technologie « BuTT »

Les Activités de l'année 2014 :

Ce rapport d'activités se rapporte aux activités des différentes structures de recherche du CBS durant l'année 2014 (la 4ème année du contrat programme signée le 29 mars 2010 entre le Centre de Biotechnologie de Sfax et le Ministère). Il résume les efforts réalisés par les différentes équipes de recherche et de valorisation. Il contient, en plus, un aperçu sur les activités de soutien et d'accompagnement assurés par les services de ressources humaines et financier, l'administration, la bibliothèque, la coopération internationale, la production scientifique, le rayonnement scientifique et l'ouverture sur l'environnement.

Dans sa majeure partie scientifique, le document résume les résultats obtenus par chaque équipe durant l'année écoulée. Le CBS dispose de toutes les compétences et ressources humaines pour réussir les nouveaux objectifs fixés dans ce contrat programme à savoir la valorisation des résultats de la recherche, le transfert technologique et surtout de maîtriser et comprendre la notion de « produit de la recherche ».

Le CBS est structuré en 4 Laboratoires de Recherche :

1- Laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production de Protéines chez les Eucaryotes (LVBPPE)

2- Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)

3- Laboratoire de Protection et Amélioration des Plantes (LPAP)

4- Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB)

- Service d'Analyse

Le personnel du Service Analyse:

- Pr. Hafedh Belghith : Responsable
- Mme : Najla Masmoudi : Ingénieur
- Mlle : Fatma Rezgui : Ingénieur
- Mlle : Lobna Jlaiel : Technicienne
- Mme : Hajer hassairi : Technicienne
- Mr : Walha Kamel : Technicien
- Nessrine Kchaou : Technicienne

Le Service Analyse du CBS effectue diverses catégories d'analyses utilisant des méthodes reconnues ainsi que des équipements de pointe. Nos services s'adressent aux chercheurs, aux organismes gouvernementaux et privés et aux industriels. À l'aide de ces appareils et de nos ressources humaines, l'Unité Analyse du CBS peut offrir sous forme de service des analyses sollicitées par des chercheurs de différentes universités tunisiennes en plus de quelques industriels de la région.

Ces analyses sont soit de type quantitatif ou qualitatif : suite à la séparation des différents constituants de l'échantillon, on effectue une purification de l'un ou de plusieurs produits de l'échantillon.

Les purifications effectuées portent essentiellement sur des substances ayant une ou plusieurs activités biologiques et sont, soit des protéines soit des molécules simples.

Le Service Analyse du CBS possède les équipements lourds suivant :

- La chromatographie liquide haute performance : HPLC Agilent ; HPLC Knower Préparative ; HPLC (Agilent) UV ; HPLC ionique ; FPLC BIORAD en plus
- La spectrométrie de masse liée à la chromatographie liquide LC MS/MS et à la chromatographie gazeuse la GC/MS
- un analyseur d'ADN, un séquenceur Haut débit et un microscope Confocale (Monofocale) à Balayage Laser Conventionnelle (monophotonique) sont à la disposition des chercheurs et de quelques industriels.En plus nous avons acquis 3 Appareils :
- QPCR
- Une électrophorèse automatisée
- un lecteur de plaque spectro-photométrique et fluorometrique

INVENTAIRE DES ANALYSES DE L'ANNÉE 2014

Des analyses effectuées par les chercheurs des différents laboratoires

Les travaux effectués sont résumés sur le **tableau 1**

Tableau 1 : analyses effectués par le Service Analyse

	GC/MS	LC/MS	HPLC Agilent 1200	HPLC Préparative	FPLC
LBPE	**121**	**103**	*****	**20**	*****
LVBPPE	**2**	**15**	**50**	**125**	**173**
LPAP (Biopesticides)	**17**	**12**	**36**	**30**	**9**
LMB		**2**	**90**	**60**	**18**
LMB (pharma)	**15**	*****	**4**	*****	*****
LPAP	**2**	*****	*****	*****	*****
U. Valorisation	**4**	*****	*****	*****	*****
Externes	**39**	**6**	**21**	*****	*****
Total	**213**	**138**	**224**	**235**	**200**

La spectrométrie de masse liée à la chromatographie liquide haute performance : LC-MS/MS

En ce qui concerne la spectrométrie de masse liée à la chromatographie liquide haute performance, nous continuons à travailler sur des molécules simples issues de différents laboratoires du CBS et essentiellement les laboratoires LBPE et LMB, plusieurs autres demandes portant sur des molécules de plus grandes tailles sont en cours de réalisations. Quelques essais ont été réalisés pour l'Institut Pasteur de Tunis et le LBGEL de l' ENIS, .

Pour la plupart des analyses effectuées, le but reste toujours pour la détermination de la masse exacte de molécules ayant certaines activités biologiques et dans certains cas, l'étude structurale par fragmentation en mode MSMS.

L'analyseur d'ADN

Les séquences sont réalisées à partir des matrices (plasmides, produits PCR), et actuellement nous séquencons de plus des Cosmides. La réaction de séquençage proprement dite est réalisée à l'aide des kits: BigDye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems).

Nous avons cherché à abaisser le prix de revient de l'analyse, pour cela nous avons utilisé d'autres produits et nous avons mis en œuvre les processus de surveillance, d'analyse et d'amélioration nécessaires pour démontrer la conformité des analyses.

Séquençage d'ADN effectué par les chercheurs des différents laboratoires du CBS

Les travaux effectués sont résumés sur le tableau 2

Tableau 2: analyses effectués par le Service de Séquençage

Séquenceur 4 capillaires

Labo	Nb séquences	N Bonnes séquences	
LMB pharma	623	518	83%
LVBPPE	307	155	50%
LMB	129	77	60%
LPAP Biopestisides	125	58	46%
LBPE	443	286	64%
LPAP	236	168	71%
LMB Pharma AR	132	51	39%
TOTAL	1995	1313	66%

Séquençage d'ADN Génomique effectué par les chercheurs du CBS par le séquenceur Haut débit

Les travaux effectués sont résumés dans le tableau3

Tableau 3: analyses effectués par le Service de Séquençage

Séquençage d'ADN Génomique	Bactérie	Champignon	16 S	Exomes
LMB(Mr.Samir Bejar)	3	-	1	-
LMB (Mr. Saber Masmoudi)		-	-	2
LVBPPE (Mr. Ali Gargouri)	1	2	-	-
LBPE	-	-	5	-
LPAP Biopesticides	3	-	-	-

Il faut noter que le séquençage génomique est une première au CBS et même en Tunisie.

L'analyse des séquences nécessite une formation en bioinformatique spécialisée en plus d'une connaissance avancée en protéomique et en génomique pour pouvoir profiter du séquenceur

Haut débit du CBS. Il est utile de participer aux formations du cadre technique par des stages et de participations à des manifestations scientifiques.

CONCLUSION

Le Service Analyse continuera à travailler pour le compte des laboratoires et des unités du Centre de Biotechnologie de Sfax. Il vise une plus grande ouverture sur le monde extérieur par l'établissement de nouvelles collaborations avec le milieu universitaire d'une part et les industriels d'autre part.

Enfin pour pouvoir répondre à la variété des demandes d'analyses et proposer une prestation digne, le Service Analyse cherche toujours à élargir sa gamme de matériels nécessaires et utile pour ces différentes analyses et à participer aux formations du cadre technique par des stages et des participations à des manifestations scientifiques.

Le Service Analyse du CBS va acquérir prochainement d'autres appareils, une plateforme génomique et une plateforme protéomique pour mieux assurer le fonctionnement et la demande des chercheurs du CBS et faire du service pour les universitaires et les industriels régionaux et nationaux.

- Pépinière d'entreprises du Centre de Biotechnologie de Sfax

Communication

- Participation au salon universitaire « univexpo » organisé par l'Université de Sfax le 7 et 8 Juillet 2014. Cette participation vise à consolider davantage l'intégration du CBS dans son environnement socio-économique en permettant de promouvoir les startups existantes et les recherches faites au Centre.
- Présentation de l'expérience du CBS en création d'entreprises à l'institut de l'olivier, lors d'une mi- journée organisée le 10/06/2014 par la pépinière d'entreprise de l'APIA sous le thème des incubateurs spécialisés.
- Visite des élèves ingénieurs en deuxième année du cycle ingénieur de l'école polytechnique de Sousse aux locaux de la pépinière, le 16 avril 2014.

Start-up hébergée jusqu'à Juillet 2014

BIOtech RDP ***Recherche, Développement et Production***

Responsable : Olfa Jrad **Titre:** Technicienne

Création : 10/ 6/2008 Tél /Fax: (+ 216) 74 874 385

Incubation au CBS depuis 2008;

Hébergement à la pépinière depuis Février 2011;

Email : biotech_rdp@yahoo.fr **Emplois créés** : **2** nouveaux diplômés et un Mobipostdoc

Définition du projet:

- Production d'Anticorps sur commande,
- Recherche Développement de Kits immunologiques et de Réactifs (antigènes pour tests de diagnostic),
- Formation en techniques immunologiques,
- Diagnostic de pathologies neuro-musculaires par Western Blot
- Diagnostic vétérinaire,
- Analyse in vitro

Formation du personnel de la pépinière

- Participation au cycle de formation « Transfert de Savoir et de Technologie » organisé par la Coopération Allemande au développement GIZ dans le cadre des activités de la composante

i9 TST du PASRI (Programme d'appui au système de Recherche et Innovation, financé par l'Union européenne) : début du cycle Janvier 2014, fin Octobre 2014.

- Participation aux actions et formations organisés par le Centre d'affaires de Sfax.

- Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR)

Le personnel de l'UVRR

Mr. Ilem HASSAIRI : Ingénieur en Chef/ Responsable de l'unité
Mr. Adel ZITOUN : Ingénieur Principal
Mme. Najoua AYEDI : Ingénieur Principal
Mme. Imen REKIK **:** Assistant de labo Principal
Mr. Nizar ELEUCH :Assistant de labo
Mr. Kamel M'RAD :Assistant de labo
Mr. Faiçal BOUKHILI :Technicien
Mr. Haitham MILADI : Agent technique
Mr. Mohamed AMRI :Ouvrier

Les activités de l'UVRR

Durant l'année 2014, Les activités de l'Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR) sont principalement subdivisées en deux volets :

- Valorisation ou extrapolation des résultats de la recherche en concertation étroite avec les laboratoires de recherche du CBS
- Fonction de 'Services' de l'unité UVRR : Assistance des laboratoires du CBS dans la réalisation d'expériences de fermentation, de séparation et d'essais.

I.Développement et extrapolation des résultats de la recherche

Les principaux projets de recherche réalisés sous le volet développement des résultats de la recherche au sein de l'UVRR sont les suivants :

1. Développement d'un procédé économique de production de protéases à base de tris de déchets de thon en utilisant deux souches de *Bacillus subtilus* PNZ1 et PNZ2 isolées et modifiées génétiquement au laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB).
2. Extrapolation de la production des cellules recombinantes d'*Echerichia coli* exprimant les deux activités enzymatiques à savoir la glucose isomérase (GI) et la L-arabinose isomérase (L-AI) à partir du Lactosérum

Ces projets ont été réalisé en collaboration étroite avec le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB)

1. *Développement d'un procédé économique de production de protéases à base de tris de déchets de thon*

Les protéases sont de plus en plus utilisées dans les procédés de transformation en tant qu'agents actifs incorporés dans de nouveaux produits tels que les lessives. Dans ce contexte, plusieurs recherches sont menées au sein du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS portent sur la production des protéases alcalines Chez deux souches recombinantes de *Bacillus*. Certains d'entre eux sont transférés à l'UVRR. En effet**,** à l'unité de Valorisation des Résultats de la Recherche du Centre du CBS, un programme de recherche - développement sur les procédés de fermentation et de formulation de ces enzymes chez les souches de *B.subtilis/ pNZ2* et

B.subtilis/ pNZ1 qui codent pour la synthèse de protéases alcalines nous a été confié pour son développement à l'échelle pilote. L'objectif principal de ce projet de recherche est d'extrapoler la production des protéases alcalines dans des fermenteurs de capacités croissantes allant de 7 litres à 100 Litres et de développer un procédé fiable et reproductible de production et de formulation des protéases à partir de déchets de thon. La méthode de recherche adoptée, consiste à étudier les problématiques pouvant être rencontrées à l'échelle pilote avant le passage à l'échelle industrielle.

La mise en place d'un procédé de production de protéases à partir des déchets de thon a nécessité une optimisation des étapes d'hydrolyse et d'extraction des extraits protéiques du déchet de thon. Pour ce faire, un traitement thermique associé ou traitement chimique est utilisé (Partie 1.1). La séparation et la clarification des extraits sont faites par la microfiltration tangentielle. Ainsi, les conditions opératoires de cette opération unitaire sont optimisées. Les conditions de culture et de la production d'enzymes par fermentation dans un fermenteur de capacité 100 litre sont optimisées et la faisabilité technologique de ce projet est étudiée (Partie 1.2).

1.1. Prétraitement des sous produits de thon

Les sous produits de thon sont riches en protéines solubles et surtout en protéines non solubles. L'exploitation de ces sous produits en vue de leur valorisation sous forme de milieu de culture nécessite une étape d'hydrolyse préalable des protéines insolubles. Des travaux antérieurs, réalisés auparavant à l'UVR, ont montré que la digestion enzymatique ou chimique des déchets de thon stimule la croissance et la production des protéases chez les souches de *Bacillus subtilis testées.* La température, la concentration d'enzyme, le pH du milieu et le temps de la digestion sont optimisées en fonction de la quantité du produit. A la lumière des résultats obtenus, nous avons pu constater qu'en termes de rendement, l'augmentation du pH de 12 à 14 à augmenté le taux d'hydrolyse (de 48% à 87 %). Toutefois, l'acidification du milieu à des pH inférieur a réduit le taux d'hydrolyse. Par ailleurs l'augmentation de l'Extrait sec du déchet de thon au delà de 5% et le temps d'incubation au delà de 6 heures n'ont pas amélioré le degré d'hydrolyse (87%). Il est à noter que les meilleurs rendements de digestion sont obtenus suite à une digestion chimique, soit à pH égale à 14 et un extrait sec de 5%. Le rendement maximal obtenu suite à une digestion enzymatique par les alcalases ou les neutrases n'a pas dépassé les 59%. La séparation de la phase solide-liquide du digestât, pour la récupération des extraits protéiques solubles est réalisée par le procédé basé sur la technologie membranaire.

Après des études d'optimisation réalisées sur la détermination des conditions opératoires optimales des procédés membranaires (MF), les bilans massiques établis montrent que les fractions de protéines retenues par les membranes de MF sont faibles et n'ont pas dépassé les 5 %.

1.2. Extrapolation de l'étude à l'échelle fermenteur de capacité 100 l

1.2.1. Effet de la concentration en protéines du milieu de culture à base de sous produits de thon sur la croissance et la production des protéases

Afin d'optimiser, dans la formulation du milieu de culture, la concentration des sous produits marins utilisés comme seule source d'énergie pour la croissance et la production de protéases chez les souches *Bacillus subtilus* PNZ1 et PNZ2, différentes concentrations en protéines du surnagent des sous produits de thon ont été testées à savoir : 10, 17 et 22.5 g/l. Les conditions de culture à savoir la température, l'agitation et l'aération qui ont été retenues pour tous les essais sont respectivement égales à 37°C; 300 trs/min et 1 vvm.

A la lumière des résultats obtenus (Tableau 1 et 2), nous avons pu constater qu'en terme de productivité, l'augmentation de la concentration en protéines des sous produits de thon de 10 g/l à 22.5 g/l n'a pas amélioré ce paramètre (2.68 10^5 U/l.h contre 2.3 10^5 U/l.h chez la souche PNZ1). Toutefois, l'ajout des sous produits de thon à une concentration en protéines de l'ordre de 22.5 g/l a réduit la croissance des souches testées (de 9 10^9 UFC/ml à 8 10^9 UFC/ml pour la souche PNZ1 et de 10^9 UFC/ml à 7 10^9 UFC/ml pour la souche PNZ2) ainsi que le rendement (de 9.6 10^5 U/g protéine à 6.8 10^5 U/g protéine pour la souche PNZ1 et 1.1 10^6 U/g protéine à .76 10^6 U/g protéine pour la souche PNZ2).

Par ailleurs, il est à noter que les meilleurs rendements de production d'enzymes sont obtenus à une concentration moyenne en protéines, soit égale à 17 g/l et ceci pour les deux souches testées.

Tableau 1 Effet de la variation de la concentration en protéines des sous produits de thon sur les paramètres cinétiques de la croissance et la production de l'activité enzymatique des protéases chez de la souche de *Bacillus subtilis PNZ1*

Concentration en protéine (g/l)	**10**	**17**	**22.5**
Activité d'enzyme (U/ml)	6180	16363	15273
Biomasse (UFC/ml)	ND	9 10^9	8 10^9
Activité spécifique	ND	1.8 10^{-6}	1.9 10^{-6}
Rendement (U/g protéine)	6.1810^5	9.6 10^5	6.8 10^5
Productivité (U/l.h)	2.68 10^5	2.4 10^5	2.3 10^5

Tableau 2 : Effet de la variation de la concentration en protéines des sous produits de thon sur les paramètres cinétiques de la croissance et la production de l'activité enzymatique des protéases chez de la souche de *Bacillus subtilis PNZ2*

Concentration en protéine (g/l)	**10**	**17**	**22.5**
Activité d'enzyme (U/ml)	11000	24000	17300
Biomasse (UFC/ml)	10^9	10^{10}	7 10^9
Activité spécifique	1.110^{-6}	2.4 10^{-6}	2.5 10^{-6}
Rendement (U/g protéine)	1.110^6	1.4 10^6	0.76 10^6
Productivité (U/l.h)	3.6 10^5	4 10^5	3.6 10^5

1.2.2. Effet de l'aération

Une étude d'optimisation des conditions d'aération (assurées par l'agitation et le débit d'air) a été ainsi réalisée. Il est à noter que l'étape de l'extrapolation de la production de protéase à l'échelle fermenteur (fermentation aérobic) nécessite surtout la mise au point du couple agitation / aération afin de pouvoir maximiser le transfert d'O_2 dans le milieu réactionnel et fournir le besoin énergétique optimal pour la croissance de la souche et la production du métabolite recherché. Les conditions de culture à savoir la température et le pH retenues pour tous les essais sont respectivement de 30°C et 7.

L'analyse des résultats obtenus a montré que les meilleures productions de protéases et productivités ont été obtenus sous une vitesse d'agitation égale à 250 tr/min et un débit d'air de 0.6 vvm pour la souche PNZ1 contre une vitesse d'agitation égale à 250 tr/min et un débit d'air de 1 vvm pour la souche PNZ2. Par ailleurs, Sous ces conditions optimales, la production de protéases et la productivité obtenues ont été respectivement de 22000 u/ml et de 550 U/ml.h chez la souche PNZ1 et de 26000 et 650 U.ml.h chez la souche PNZ2. Sous un faible taux d'oxygénation (0,3 vvm), le taux de croissance est ralenti. Cependant, l'augmentation de la vitesse d'agitation au-delà de 250 rpm cause une formation de mousse, ainsi des problèmes techniques sont apparus. Il est clair que les deux souches de *Bacillus* se comportent différemment. Une étude approfondie des éléments de base qui sont le transfert d'oxygène et le transfert de la matière seront étudiés en perspectives.

1.3. Procédé de séparation et de concentration d'enzymes

Le procédé de traitement en aval du milieu fermenté appliqué pour la récupération des protéases est basé sur la technologie membranaire. Après des études préliminaires réalisées sur la détermination des conditions opératoires optimales des procédés membranaires (MF et UF) utilisées, les jus de fermentation ont été filtré tangentiellement sur une colonne de microfiltration de 0.2 □m dans les conditions suivantes : une pression transmembranaire de 1.7 bar, une vitesse de circulation de 3 m/s et une température constante de 30°C, afin de concentrer la solution enzymatique par Rotavap sous vide.

Les bilans massiques établis montrent que les fractions de protéases retenues par les membranes de MF et favorisant la couche de polarisation sont inférieur à 15 % pour les jus des deux souches testées. Le filtrat ainsi obtenu est alors concentré sous vide par unité de Rotavop à une température de 50°C. Les pertes d'activités enregistrées au cours de cette étape sont faibles ne dépasse pas les 5%. Ces pertes dépondent étroitement aussi bien du temps de séjour du produit que de la température appliquée.

1.4. Production des enzymes en grande quantités

La production de quantités importantes d'enzymes (des centaines de litres) en fermenteur de capacité totale 100 Litres sont réalisées et transférer aux monde socio-économique afin de pouvoir les tester dans les deux domaines de la détergence et de la tannerie. En effet, nous avons étudié et manipulé toutes les opérations unitaires de production et de formulation de l'enzyme à l'échelle

pilote. L'optimisation des fermentations dans des fermenteurs de volumes croissants, la formulation des enzymes ainsi que la production des quantités considérable ont été réalisées en étroite collaboration avec les membres du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS.

2. Extrapolation de la production des cellules recombinantes exprimant les deux activités enzymatiques à savoir le GI et la L-AI

Le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules 'LMB' a développé à l'échelle laboratoire un procédé de production d'un sirop riche en D-Fructose et en D-tagatose à partir du lactosérum. Ce procédé nécessitera la production des cellules recombinantes exprimant les deux activités enzymatiques à savoir le GI et la L-AI, par la technologie de fermentation. A l'unité de Valorisation des Résultats de la Recherche du Centre du CBS, un programme de recherche - développement sur les procédés de culture et de production de ces enzymes chez la souche *recombinante* (la GISK/F53L G219D et la L-AI qui codent pour la synthèse de glucose isomérase (GI) et de la L-arabinose isomérase (L-AI) nous a été confié pour son développement à l'échelle pilote. L'objectif principal de ce projet de recherche est de produire des concentrations en cellules élevées à bas prix. Pour cela et afin d'abaisser les coûts de production, les stratégies adoptées au sein de l'UVVR sont d'une part rechercher à substituer le milieu de production LB par un milieu à bas prix et à bon marché. À ce propos, le lactosérum sont jugés comme étant un substrat prometteur et d'autres part à appliquer la technique de fermentation en semi continu afin de pouvoir favoriser la croissance en phase exponentielle et augmenter la productivité de l'opération de fermentation.

2.1 Etude en erlenmeyers

Dans le but de choisir un milieu très économique et non coûteux pour la production des souches recombinantes la GISK/F53L G219D et la L-AI, un milieu à base de rejets industriels liquides (lactosérum doux) et un milieu synthétique (LB) sont choisis comme milieux de culture.

Afin d'évaluer la capacité de la souche d'*E.coli* à croître dans un milieu économique à base de lactosérum, différents milieux de culture ont été formulés (M1, M2et M3) comme suit :

- M1: Milieu synthétique 2 LB supplémenté de glucose à une concentration de 10 g/L.
- M2 : Milieu à base de lactosérum renfermant une concentration de l'ordre de 10 g/L de sucres totaux supplémenté de glucose à une concentration de 10 g/L.
- M3 : Milieu à base du lactosérum renfermant une concentration de l'ordre de 10 g/L de sucres totaux.

Les conditions de culture retenues pour tous les essais à savoir la température et la vitesse d'agitation sont de 37°C et 250 trs/min, respectivement.

Tableau 3. Croissance et production d'enzymes chez *E.coli* sur différents milieux

Milieu	Activité de glucose isomérase (U/mg)	Biomasse DO	Activité spécifique (U/mg.DO)
M1	45.2	14.2	3.18
M2	41.5	12.8	3.24
M3	38	10.8	3.5

Les résultats montrent que la souche se développe de manière très efficace dans les milieux à base du lactosérum. Après 24 h d'incubation, la concentration en cellules la plus importante est obtenue en présence du milieu 2 LB supplémenté de glucose à une concentration de 10 g/L (M1). Elle est de 14,2 unités DO. Les activités spécifiques maximales de production de glucose isomérase chez la souche testée sont obtenues dans le milieu à base du lactosérum à une concentration en lactose de 10 g/L (M3).Il est clair que la souche testée se comporte différemment d'un milieu à l'autre et que l'ajout de glucose est défavorable pour la synthèse d'enzyme chez *E.coli*. Par exemple, après 24 h d'incubation dans le milieu à base de lactosérum renfermant une concentration de l'ordre de 10 g/L de sucres totaux supplémenté de glucose à une concentration de 10 g/L (M2), la concentration d'enzymes en terme d'activité obtenue est de l'ordre de 38 U/mg alors qu'elle est seulement de 41,5 sur le milieu M3. Par conséquent, le rapport C/N dans le milieu de culture influence la croissance et la synthèse d'enzymes chez la souche utilisée. Les travaux réalisés en erlenmeyers montrent que le lactosérum est un substrat riche en protéines nécessaires pour la synthèse et l'induction de l'activité enzymatique recherchée chez la souche recombinante testée.

2.2.Etude en fermenteur

Afin de réaliser une extrapolation de la production des cellules recombinantes exprimant les deux activités enzymatiques glucose isomérase (GI) et L-arabinose isomérase (L-AI) en fermenteur, les conditions de culture en batch et en batch-alimenté de production des cellules recombinantes (la GISK/F53L G219D et la L-AI) exprimant les deux activités enzymatiques, sont étudiées dans des fermenteurs de capacités croissantes allant de 3 Là 7 L en utilisant des milieux de culture à base du lactosérum.

De ce fait, plusieurs fermentations en batch sont réalisées dans des fermenteurs de capacités 3 litres et 7 litres ayant pour objectives l'extrapolation de la production des cellules de la souche recombinante fournie par le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS sur un milieu à base de lactosérum.

Une étude d'optimisation de la concentration du lactosérum–est ainsi réalisée et les paramètres cinétiques de la souche testée sont déterminés (Rendement 0,44%, µmax 1,05h^{-1}).L'analyse des résultats obtenus montrent que les meilleures croissances et productions d'enzymes et productivités sont obtenues sous une concentration du lactosérum exprimée en degré Brix égale à 1%. Ces

travaux permettent de démontrer qu'un milieu de culture formulé à base du lactosérum renfermant une concentration de l'ordre de 10 g/L de sucres totaux, permet d'obtenir une production de cellules en batch de l'ordre de 8 unités DO.

Par ailleurs, sous une concentration supérieure, la production d'enzymes et la productivité obtenue sont inférieures et marquent des valeurs de 39,6 u/mg et de 4,95 u/mg.h, respectivement. Par contre, elles enregistrent des valeurs supérieures lors de l'utilisation d'un milieu 2LB (de 45,2 u/mg et de 5,65 u/mg.h, respectivement).

Les fermentations réalisées en batch alimenté, après 5 heures d'alimentation sous un taux de croissance égale à $0.7h^{-1}$ permettent d'atteindre un nombre de cellules 4 fois plus élevé (32unité DO) et une activité spécifique comparable.

L'extrapolation de cette étude, montre la nécessité de l'engagement d'une équipe travaillant en continu (24 heures / 24) afin de pouvoir ajuster périodiquement le débit d'alimentation et contrôler rigoureusement les conditions de culture.

II. Prestation de services pour les différentes structures de recherche du CBS

L'Unité de Valorisation des Résultats de la recherche assure également une assistance aux différents laboratoires du CBS dans la conduite de fermentations, de séparations et d'essais. Citons par exemple :

- Séchage par lyophilisation des solutions protéiques, enzymatiques et de micro-organismes.
- Concentration par la technique d'évaporation sous vide.
- Application des procédés membranaires à savoir la MF et l'UF pour la séparation et la purification de biomasses et des biomolécules et autres.
- Réalisation d'expériences de fermentations en mode batch, batch-alimenté et en continue.

Les principaux travaux réalisés, dans le cadre de cette thématique, pour le compte des laboratoires du CBS sont les suivants :

1. Réalisation de six fermentations en batch et en batch alimenté dans des fermenteurs de capacités 7 L et 20 litres pour la culture des microorganismes fongiques et la production de leurs métabolites (cellulases et autres) et ceci pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse du CBS.

2. Réalisation des cultures de micro-algues en batch et en continue dans des photo réacteurs de capacités totales 15 litres et ce pour le compte du laboratoire des procédés environnementaux.

3. Réalisation d'une dizaine de fermentations en batch dans des fermenteurs de volumes croissants de 5l, 20 L et 100 litres pour la culture des souches de *Bacillus theringensis* et la production des Biopesticides. Ces fermentations sont réalisées pour le compte de l'unité de Biopesticidés du CBS.

4. Réalisation de 5 fermentations pour la production de biomolécules à activité antifongique ou antibactérienne dans un fermenteur de capacité totale 5 litres. Cette production est réalisée pour le compte du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS.

5. Réalisation des réactions d'hydrolyse et de digestion pour la production de biomolécules et des extraits agroalimentaires dans des réacteurs de capacités totales 20 litres. Cette production est réalisée pour le compte du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS et le laboratoire des procédés environnementaux.

6. Application des procédés membranaires à savoir la MF et l'UF pour la séparation et la purification d'une centaine de litres de solutions enzymatiques (cellulases, protéases etc.), biomasses (*E.coli*, *Bacillus theringensis* etc.), biomolécules (antioxydants, antifongiques etc.)et des matières brutes en solution (Lactosérum, margines etc.).Ces services sont offerts aux différents laboratoires et unités du CBS.

7. Concentration d'une centaine de litres de~~s~~ solutions (jus enzymatiques, biomolécules etc.) par la technique d'évaporation sous vide. Cette opération est réalisée pour le compte du Laboratoire de Microbiologie et biomolécules et pour le Laboratoire des procédés environnementaux du CBS.

8. Séchage par lyophilisation de~~s~~ solutions protéiques, enzymatiques et de micro-organismes. Cette opération est réalisée pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse, pour le laboratoire des procédés environnementaux et pour le laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS.

9. Broyage (broyeur mécanique, mixeur) de la cellulose, du maïs, et des produits pâteux. Cette opération est réalisée pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse, de l'unité de biopesticides et du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS.

10. Stérilisation par autoclavage de~~s~~ milieux de cultures, de~~s~~ solutions préparées et du matériel destiné à être utilisé stérilement. Ces services sont offerts aux différents laboratoires et unités du CBS.

11. Analyses physico-chimiques offertes aux différents laboratoires et unités du CBS à savoir : dosage d'azote (organique et minérale) par la méthode de Kjeldahl (minéralisation, distillation, dosage), mesure spectral UV-visible. Ces analyses sont réalisées pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse, du laboratoire des procédés environnementaux, et du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS.

- Unité d'Information et de Documentation Scientifique

Le Personnel de l'unité

- Mr. Ramzi REKIK : bibliothécaire documentaliste, responsable de l'unité d'information et de documentation scientifique
- Mme. Wassila YAHAWI: secrétaire d'administration

Les activités de l'unité

L'information scientifique et technique (I.S.T.) est l'ensemble des informations produites par la recherche et nécessaires à l'activité scientifique. L'auteur-chercheur est au cœur du processus de production de la connaissance : il est à l'origine des recherches qui ont été menées et il est responsable de la diffusion des résultats de sa recherche. Cette diffusion se fait par le biais des publications scientifiques. L'information scientifique et technique doit circuler le plus largement, rapidement et efficacement, tout en étant de la meilleure qualité possible, car cette diffusion participe pleinement au fonctionnement de la recherche.

Dans ce cadre, et à fin de permettre aux chercheurs du centre, ainsi qu'aux acteurs du tissus universitaire régional et national, un accès sécurisé et rapide aux sources d'informations scientifiques et aux bases de données de renommé internationale, l'unité d'information et de documentation scientifique du Centre de Biotechnologie de Sfax s'est doté d'une bibliothèque numérique garantissant un environnement de recherche bibliographique favorable via les outils logistiques suivants :

- Nombre d'ouvrages: 736
- Nombre des périodiques récents: 27 titres
- Les accès libre aux bases de données, exemple: Elsevier, Wiley Interscience, Springer, Scopus, Springer protocols…
- Nombre de poste PC: 10 postes, et accès wifi pour les PC portable

Ces ressources d'informations scientifiques vont être renforcées prochainement par la mise en place de la base « Technique de l'Ingénieur » qui couvre plus que8000 articles scientifiques et techniques en français et les services associés pour aller plus loin dans les recherches documentaires et bibliographiques.
« Techniques de l'Ingénieur » est la base de référence des bureaux d'études et de la conception, des directions techniques, de la R&D, de la recherche et de l'innovation industrielle.

Pour permettre une utilisation optimale des ressources ci-dessus citées, et à fin de respecter les normes internationales en terme de bibliographie et de diffusion de l'information scientifique et technique, l'unité d'information et de documentation scientifique à procédé aux actions suivantes :

- Formation des nouveaux chercheurs sur: le moteur de recherche firefox et ces compléments comme zotéro et autre
- Présentation des plateformes Springer pour les revues et les livres en format électronique, et à la formation de la ressource Springer Protocols en collaboration avec l'éditeur Springer
- WEB 2.0 et ses applications en documentation

- Service de Maintenance

Durant l'année 2014 le service Bâtiment et équipements du CBS à effectué les missions suivantes :

- La maintenance corrective de certains appareils scientifiques dans les laboratoires et l'unité de valorisation.
- La maintenance systématique et préventive de tous les Equipements techniques des bâtiments (poste de transformation électrique 800 KVA, compresseur d'air à vis, de la station de traitement des eaux, Centrale de détection d'incendie, le Groupe électrogène, et de la climatisation centrale du centre
- L'établissement des contrats de maintenance pour les chambres froides, Ascendeur, jardin et le système de détection d'incendie.
- Modification de la conception du poste TGBT et passage du comptage MT au comptage BT.
- L'assistance, le suivi et le contrôle de tous les travaux de sous-traitances de maintenances des appareils et des équipements
- Modifications nécessaires sur certains appareils pour les adapter aux travaux des chercheurs.
- L'acquisition d'une chaudière à vapeur de 340 Kg/h.
- L'acquisition des équipements scientifiques.
- Apporter des modifications sur le réseau des eaux pour l'amélioration de la qualité d'eau et réduire le coût de maintenance
- Application du programme de la réduction de la consommation d'énergie, la réduction de consommation.

Membres du Conseil Scientifique

- Sami Sayadi	Directeur Général du CBS,
- Abdallah choura	Secrétaire général et rapporteur
- Ali Gargouri	Directeur de laboratoire, Membre
- Samir Bejar	Professeur, Membre
- Hafedh Belguith	Représentant du corps A, Membre
- Slim Tounsi	Directeur de laboratoire, Membre
- Saber Masmoudi	Représentant du corps A, Membre
- Lotfi Mellouli	Représentant du corps A, Membre
- Habib Khoudi	Représentant du corps B, Membre
- Raida Zgal	Représentant du corps B, Membre
- Sonia Khoufi	Représentant du corps B, Membre
- Hekma Ayadi	Représentant des ingénieurs
- Fathi Aloui	Représentant des ingénieurs

Représentants sur les domaines socio-économiques

- Zoubeir Ben Saad (SIMED)
- Tayeb Romdhane(ANGED)
- Noureddine El Agrebi (Ministère de l'Industrie et de la Technologie)
- Zied Borji (Centre Technique de l'Agriculture Biologique Chatt-Mariem)

1- Budget du CBS :

Budget Provenant du Ministère en DT	**Titre I: 542.800.000**
	Titre II: 0
	Equipement scientifique: 300.000.000
	Equipement administratif:50.000.000
Secteur Economique	**62.063.972**
Coopération Internationale: **1/Projets Multilatéraux (**)** **2/Organismes internationaux :** IFS, IRD, ICGEB. **3/ Projets bilatéraux :** (*)	 144.122.802 DT + 30.486.470 euro (pr. Bioprotech) 73.805.481 DT 52.200.000 DT
Coopération Internationale (Total)	270.128.283 DT + 30.486.470 euro
Autres sources	4.520.580 DT

(*)Projets DGRS/CNRS (2)/etPHC-UTIQUE (3) dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française ; projets relevant de la, coopération Tuniso- Egyptienne (3) et 1 projet relevant de la coopération Tuniso- Algérienne (1

(**) Projet Euro-méditernnéen « TREASURE » et projets du 7eme PCRD de l'UE , Cinea, Clara, Waterbiotech et Biorotech gérés par l'Agence Nationale de Promotion de la Recherche Scientifique du Ministère « ANPR »

2/ Effectif du CBS :

Année	2014
Enseignants Chercheurs	50
Corps Technique	64
Administratifs + ouvriers	41
Effectif Total	155

3/ Liste des Enseignants Chercheurs et Ingénieurs du CBS :

Nom et Prénom	Position
Sami Sayadi	Professeur Directeur Général du CBS Directeur d'un laboratoire
Samir Bejar	Professeur Directeur d'un laboratoire
Khaled Masmoudi	Professeur détaché
Ali Faouzi Gargouri	Professeur Directeur d'un laboratoire
Samir Jaoua	Professeur détaché

HammadiAyadi	Professeur
Nabil Zouari	Professeur détaché
Raja Mokdad	Professeur
Ahmed Rebaï	Professeur
HafedhBelghith	Professeur responsable du service analyse
AbdelhafidhDhouib	Professeur
Lotfi Mellouli	Professeur
SlimTounsi	Professeur Directeur d'un laboratoire
SabeurMasmoudi	Professeur
Mohamed Sami Aïfa	Professeur
Mohamed Chamkha	Professeur
Hichem Chouayakh	Professeur
Souad Rouis	Maître de conférences
Hassen Hadj Kacem	Maître de conférences
Mamdouh Ben Ali	Maître de conférences
Faiçal Brini	Maître de conférences
Kaïs Jammousi	Maître de conférences
Habib Khoudi	Maître de conférences
Riadh Ben Salah	Maître de conférences
Bassem Jaouadi	Maître de conférences
Hichem Azzouz	Maître assistant
Aïda Hmida	Maître assistant
HassairiAfif	Maître assistant détaché
Fatma Karray	Maître Assistant
Rayda Zribi	Maître Assistant
Héla Trigui	Maître Assistant
Sonia Khoufi	Maître Assistant
Mariem Ellouz	Maître assistant
InesYaacoubi	Maître assistant
Imen Ben Abdelmalak	Maître assistant détachée
WajdiAyadi	Maître assistant
Najla Kharrat	Maître assistant
HoudaSkouri	Maître Assistant
OlfaFrikha	Maître Assistant
Mouna Choura	Maître Assistant
Walid Saïbi	Maître Assistant
Mohamed Guerfali	Maître Assistant
Sami Mnif	Maître Assistant
Ali Fendri	Maître Assistant détaché
Wafa Jallouli	Maître Assistant
Hatem Zaghdan	Maître Assistant
Mariem Ben Saïd	Maître Assistant
Zouhaïr Bouallagui	Maître Assistant
Mohamed Najib Saïdi	Maître Assistant

Ines Belhaj	Maître Assistant
Basma Hadj Kacem	Maître Assistant
Rania Ben Saad	Maître Assistant
Fatma Driss	Maître Assistant
Hatem Boubakri	Assistant
Slim Smaoui	Assistant
Manel Hamza	Technologue
FirasFeki	Ingénieur en chef
IlemHassaïri	Ingénieur en chef
Fathi Aloui	Ingénieur en chef
Ines karray	Ingénieur en chef
Hacina Ali	Ingénieur principal détachée
Hédi Aouissaoui	Ingénieur principal
Najla Fourati	Ingénieur Principal
Najoua Ayadi	Ingénieur Principal
Adel Zitoun	Ingénieur principal
Bochra Mellouli	Ingénieur principal
Fatma Rezgui	Ingénieur Principal
Riadh Ben Marzouk	Ingénieur Principal
Sami Ben Abdallah	Ingénieur Principal
Mohamed Ali Masmoudi	Ingénieur Principal
Abdelmajid Ben Abdennour	Ingénieur Principal
Monia Blibech	Ingénieur Principal
Aïda Koubaa	Ingénieur Principal
Hekma Ayadi	Ingénieur Principal

NB : Le CBS compte aussi : **3** ingénieurs de travaux, **34** techniciens; **3** Préparateurs et **7** agents techniques

4/ Coopération Internationale en cours de 2014:

Type de la Coopération	Nombre de Projets
Multilatérale	6
Bilatérale	9
Organisme International	3

a/Coopération Multilatérale

Durant l'année 2014, Le CBS a continué à entretenir 6 projets multilatéraux dont 4 projets européen du 7éme PCRD, CLARA, BIONEXGEN, WATERBIOTECH et « **CINEA** »dédié à la Coopération Euro-méditerranéenne pour le développement de l'innovation et l'exploitation dans le domaine de l'Agroalimentaire et un projet Euro méditerranéen « **TREASURE** » (Treatment and Sustainable Reuse of Effluents in semiarid climates). L'exécution du projet multilatéral

SATREPS (Valorisation of bioresources from semi-arid and arid land for regional development) financé par la JICA s'est poursuivie au cours de 2014.

b/ Coopération Bilatérale

Le CBS a été impliqué durant l'année 2014 dans 2 nouveaux Projets de coopération universitaire Tuniso-Française dont un **PHC-UTIQUE** et 1 projets **DGRS/CNRS** et a continuer à entretenir 7 autres projets dans le cadre de la **coopération Tuniso- Egyptienne** (3) ; **coopération Tuniso-Algérienne** (1) ; **PHC-UTIQUE** (2) et 1 **DGRS/CNRS**

c/ Organismes internationaux

Durant l'année 2014, le CBS a été impliqué dans un projet avec L'International Foundation of Sciences **« IFS »** et a continué sa collaboration avec 2 organismes internationaux : l'Institut Français pour le Développement **IRD** dans le cadre du laboratoire Mixte International (LMI COSYS-Med) et le Centre International de Génie Génétique et de Biotechnologie **ICGEB** dans le cadre des projets CRP-ICGEB**.**

5/ Ouverture sur l'environnement socioéconomique national et international en cours de 2014

Durant 2014 le CBS a noué deux nouvelles conventions à l'échelle nationale avec la société **SEDD** et la société **SEACNVS** dans le secteur de l'environnement. Par ailleurs il a continué sa collaboration avec 3 industriels nationaux: le **laboratoire CYTOPHARMA** à Zaghouan, le **laboratoire GALPHARMA** à Sfax et la société **SOTULUB** à Bizerte. En parallèle, le CBS a continué sa collaboration avec les industriels Français **LE SAFRE et ADISSEO** et a continué de développer des prestations et de divers services (analyses, hébergement à la pépinière d'entreprises, etc.) au profit de partenaires académiques et socio-économiques.

A/ Liste des invités étrangers :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Sren Helmark	CMCU	France	Du 07 au 11 janvier
Omar Mosbeh	PHC Utique	France	Du 17 au 21 mars
Amina Habech	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 15 mai au 30 juin
Jean-Marie Franchisse	LPAP « AIEA »	France	Du 04 au 08 septembre
Anne-Aliénor Véry	CMCU	France	Du 04 au 08 septembre

Hervé Sentenac	CMCU	France	Du 04 au 08 septembre
Juan Luis Jurat-Fuentes	ICGEB	USA	Du 28 septembre au 03 octobre
Laurence Desprès	ICGEB	France	Du 28 septembre au 03 octobre
Nabil Zweri	ICGEB	Quatar	Du 28 septembre au 03 octobre
Hesin Abourich	ICGEB	Saoudi	Du 28 septembre au 03 octobre
Pierre Busson	Tunisien /française DGRS/CNRS	France	Du 29 septembre au 04 octobre
Sidi Ali kourdeli	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 01 au 30 octobre
Bedis Abedelmelek	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 15 au 26 octobre
Juan Luis Jurat-Fuents	ICGEB	USA	Du 28 septembre au 03 octobre
Pierre Busson	Tunisien / Française DGRS/CNRS	France	Du 06 au 09 novembre
Bilel karwez	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 15 novembre au 31 décembre
Jean Luc Pernodet	CMCU	France	Du 24 au 29 novembre
Souraya Boulkour	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 25 novembre 2014 au 23 janvier 2015
Laura Baciou	Tunisien / Française DGRS/CNRS	France	Du 13 au 24 décembre
Michel Baudy-Floc'h	PHC-Utique	France	Du 15 au 19 décembre
Soizic Chevance	PHC-Utique	France	Du 15 au 19 décembre
Mouez Rhimi	PHC-Utique	France	Du 20 au 31 décembre

B/ Missions à l'étranger :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Sami Sayadi	WATERBIOTECH	Maroc	Du 06 au 12 janvier
Ali Gargouri	LVBPPE	France	Du 27 au 31 janvier
Raja Gargouri	PHC-Utique	France	Du 02 au 07 février
Sami Sayadi	CLARA	Kenya	Du 10 au 14 février
Firas Feki	CLARA	Kenya	Du 10 au 14 février
Sami Sayadi	CINEA	France	Du 16 au 23 février
Sami Sayadi	Bionexgen	Allemagne	Du 25 au 28 février
Wajdi Ayadi	LVBPPE	Angleterre	Du 23 au 26 mars
Hammadi Ayadi	LIA	France	Du 30 mars au 03 avril
Saber Masmoudi	CRP-ICGEB	Suisse	Du 14 au 17 avril
Riyad ben Salah	LMB	Turquie	Du 18 au 24 avril
Walid saïbi	Tunisien / coréen	Corée du Sud	Du 26 avril au 04 mai
Ines Yaakoubi	Tunisien / coréen	Corée du Sud	Du 26 avril au 04 mai
Sami Sayadi	Watereuse-Med	Allemagne	Du 29 avril au 04 mai
Sami Sayadi	CINEA EU-MED	France	Du 26 au 30 mai
Hammadi Ayadi	BioProtech	Suisse	Du 01 au 05 juin
Hammadi Ayadi	LIA	France	Du 09 au 11 juin
Lotfi Mellouli	CMCU	France	Du 16 au 25 juin
Faiçal Brini	LPAP « AIEA »	Italie	Du 24 au 27 juin
Souad Rouis	LPAP	Espagne	Du 24 au 28 juin
Hiched Chouayackh	ADISSEO	France	Du 02 au 07 juillet
Sami Sayadi	CINEA	France	Du 25 au 30 aout
Ilem Hassaïri	CINEA	France	Du 25 au 30 aout

Saber Masmoudi	LMB	France	Du 01 au 05 septembre
Sami Sayadi	IRD	France	Du 24 septembre au 01octobre
Souad Rouis	LPAP	Liban	Du 06 au 10 octobre
Fathi Aloui	CINEA	Espagne	Du 27 au 30 octobre
Raja Gargouri	LVBPPE	Marroc	Du 27 au 30 novembre
Ali Gargouri	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 06 au 08 Décembre
Mohamed Garfeli	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 06 au 08 Décembre
Hafed Belghith	Tunisien / Algérien	Algérie	Du 06 au 08 Décembre
Slim Tounsi	FETRIC	Allemagne	Du 07 au 15 décembre
Ali Gargouri	PHC-Utique	France	Du 10 au 15 décembre
Ines yaakoubi	LPAP	Egypte	Du 14 au 21 décembre
Sami Sayadi	Organisme étranger	Grèce	Du 21 au 25 décembre

C/ Stages à l'Etranger :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Imen Chakchouk	LMB	France	Du 05 au 25 janvier
Ines Boukhris	CMCU	France	Du 07 mars au 03 juin
MounaTriki	LVBPPE	France	Du 01 au 30 avril
Nebras Belkaroui	LPAP	France	Du 15 avril au 15 juillet
Alif Chebbi	LBPE	France	Du 01 au 31mai
Emna Ayadi	LIA	France	Du 01 au 31mai
Hanen Boukedi	LPAP	France	Du 01 mai au 30 juin
Rania Ammar	LIA	France	Du 01 au 31 mai
Sonia Khoufi	WATERUSE-MED	Allemagne	Du 04 au 01 juin

Firas Feki	WATERUSE-MED	Allemagne	Du 04 au 01 juin
Fatma Karray	WATERUSE-MED	Allemagne	Du 04 au 01 juin
Hatem Zaghden	WATERUSE-MED	Allemagne	Du 04 au 01 juin
Wafa Mihoubi	LVBPPE	France	Du 08 juin au 24 juillet
Nesrine Alleya	LVBPPE	France	Du 15 juin au 11 juillet
Habib Mahjoubi	LPAP	France	Du 16 juin au 01 aout
Mariem Baradaai	LPAP	France	Du 30 juin au 01 septembre
Mokhles Kwas	LBPE	France	Du 01 juillet au 31 octobre
Nebras bel Garoui	LPAP	France	Du 25 aout au 15 septembre
Bassem Jawedi	Tunisien /français	France	Du 15 au 30 septembre
Nedia Zeraai	Tunisien /français	France	Du 15 au 30 septembre
Dorra Hentati	LBPE/	France	Du 15 au 30 septembre
Dorra Ben Ayed	LPAP	France	Du 01 au 31 octobre
Mouna Khili	LBPE	Allemagne	Du 01 au 31 octobre
Nihel Amous	Tunisien /français	France	Du 08 septembre au 03 octobre
Faten Rmida	CRP/ICGEB	Espagne	Du 15 au 25 septembre
Asma Hamoudi	LBPE	Italie	Du 11 octobre au 11 novembre
Fatma Hadrich	LBPE/IFC	France	Du 15 octobre au 15 novembre
Ines Belhaj ben Romdhan	LVBPPE/IFC	France	Du 22 octobre au 06 novembre
Nihel Amous	LVBPPE	France	Du 13 octobre au 27 novembre
Manel Ben Abddallah	LBPE	France	Du 01 au 31 novembre

Wajdi Ayadi	Tunisien / Français DGRS/CNRS	France	Du 30 novembre au 05 décembre
Wafa Jallouli	LPAP/IFC	France	Du 01 au 15 décembre
Riadh Ben Marzouk	LMB/IFC	France	Du 07 au 21 décembre
Sonia Khoufi	LBPE/IFC	France	Du 08 au 21 décembre
Soumaya Nejeh	LMB	France	Du 01 au 31 décembre

6/ Equipements Lourds du CBS :

Désignation	Nombre	Utilité
Fermenteurs 7, 12, 20, 100, 300 et 1000 L	12	Production de biomasse, enzymes, métabolites…
Autoclaves (verticales et horizontales)	3	Stérilisation
Analyseur d'O_2 et CO_2	1	Suivi de fermenteurs
Centrifugeuses (continues et discontinues)	5	Récupération de la biomasse, préparation d'ADN, clarification…
CPG	2	Analyses
HPLC et FPLC	7	Analyses
Evaporateur rotatif	1	Concentration des produits
Appareils de filtration et un décanteur	4	Clarification des produits, récupération de la biomasse…
Lyophilisateurs, séchoir	3	Séchage des produits et des cultures microbiennes à différentes températures
Atomiseur	1	Déshydratation
Phospho imager, champ pulsé, PCR quantitative	5	Manipulation des ADN et Protéomique
Chaudière à vapeur	1	Production de vapeur
Séquenceur d'acides nucléiques	1	Séquençage d'acides nucléiques
Microscope confocal	1	Images multiples et tridimensionnelles
Microscope (droit, inversé)	2	Microbiologie
Spectrophotomètre Ultra Violet et Visible	7	Analyses physico-chimiques (Absorbance)
Spectromètre de masse couplé (LC/MS, GC/MS, GCMSMS)	3	Analyses Chimiques fines des produits
Système Bidimensionnel	1	Analyse des protéines
Station de calcul Sun Blade 2000	1	Analyse de séquences ; Bioinformatique
Lecteur de plaque	1	Analyses physico-chimiques (Absorbance, fluréscence)
Appareil de mesure de viabilité des cellules	1	Analyse moléculaire
Salle de culture	1	Culture de cellules
HPLC phase Liquide	1	Analyses
Centrifugeuse Réfrigérée	1	Centrifugation

7/ Production Scientifique :

	2014
Articles, Revues Internationales	**105**
Brevets nationaux	**3**
Brevets internationaux	**2**
Doctorats et Habilitations Soutenus	**13**
Mastères	**18**
PFE	**10**

8/ Les journées scientifiques en 2014

1. 25ème Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) organisé par l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB). Hammamet, 24 - 27 Mars 2014
2. Les Deuxièmes journées internationales sur le thème: Phototrophes aquatiques et Biotechnologie, Taxonomie, Extrêmophiles, Photosynthèse, Bioprocédés, Biocapteurs, Bioremediation. Industrialisation et Essaimage. Mahdia, 30 Mars- 1 Avril 2014
3. Atelier de Formation sur la Fermentation. De quelques fondamentaux….. vers la conduite de cultures en Bioréacteur. ISBS-Sfax, 02 - 05 Juin 2014.
4. International Conference in Integrated Management of Environment (ICIME 2014). Hammamet, 25-28 Septembre 2014
5. Theoretical and practical course intitulé: "Protein-Protein interaction: Study of Bt toxin-receptor case", financé par "International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology "ICGEB" . Du 28 Septembre au 03 Octobre 2014,
6. Premières Journées Nationales de Dynamisation de la Recherche Scientifique de l'ANPR, 15-16 Décembre 2014, Hammamet- Tunisie
7. Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2014) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) . Hammamet, 20 - 24 Décembre 2014

Laboratoire de Valorisation de la Biomasse et Production de Protéines chez les Eucaryotes

(LVBPPE)

مخبـر تثمين الكتلة الحيويّة وإنتاج البروتينات في الكائنات المعزولة النّـواة

Responsable : Pr. Ali Gargouri

Liste actualisée des membres de l'équipe de recherche

Prénom et Nom	Grade	Institution
Ali GARGOURI	Professeur	CBS
Hafedh BELGHITH	Professeur	CBS
Raja MOKDAD-GARGOURI	Professeur	CBS
Abdelmajid KHABIR	Professeur	FM Sfax
Wajdi AYADI	Maître Assistant	CBS
Houda SKOURI-GARGOURI	Maître Assistant	CBS
Mohamed GUERFALI	Maître Assistant	CBS
Hèla TRIGUI-LAHIANI	Maître Assistant	CBS
Basma HADJKACEM-HADJTAIEB	Maître Assistant	CBS
Ines BELHAJ-BENROMDHANE	Maître Assistant	CBS
Istabrak BORCHANI	Maître Assistant	FS Sfax
Boutheina HADHRI	Maître Assistant	ISB Sfax
Imen MILADI	Maître Assistant	FS Gafsa
Salma ABDELMOULA	Maître Assistant	FS Gafsa
Fatma TRIFA	Maître Assistant	ISB Monastir
Sonda GUERMAZI- TOUMI	Assistant	FS Gafsa
Ines MAALEJ	Maître Technologue	ISET Bizerte
Aida KOUBAA-FEKI	Ingénieur Principale	CBS
Lamia JMAL-HAMMAMI	Technicien de Labo	CBS
Adel SAIDI	Technicien de Labo	CBS
Nadia HADIJI-ABBES	Docteur en Génie Biologie	CBS
Dorra BEN AYED-GUERFALI	Docteur en Génie Biologie	CBS
Salma ABDELJALIL-TRABELSI	Docteur en Génie Biologie	CBS
Rania ABDELMAKSOUD- DAMMAK	Docteur en Génie Biologie	CBS

Aref NEIFAR	Docteur en Génie Biologie	CBS et INSTM-Sfax
Naourez DAMAK	Docteur en Génie Biologie	CBS
Ines BORGI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Hajer TOUNSI	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Mouna ALOULOU	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Azza HADJ SASSI	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Wafa MIHOUBI	Thèse (Sciences Biologiques)	FS BIZERTE
Sihem IBN ABID	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Yosra KAMMOUN	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Hanen MALLEK	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Ines BEN HMAD	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Awatef TAKTAK- BEN AMAR	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Manel BOUDABBOUS- BENAMOR	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Nihel AMMOUS- BOUKHRIS	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Nisrine ALLAYA	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Emna KTATA	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Amena SAADALLAH- KALLEL	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Emna DABBECHE	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS et PARIS 5
Mouna TRIKI	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS et IRCM Montpellier
Rabaa BEN AYED	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
HELA MKAOUAR	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS et INRA PARIS
Aicha KRIAA	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS et INRA PARIS
Inès AYADI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Omama KAMMOUN	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS

A- Productions scientifiques et diplômantes et Ouverture sur l'environnement

I. Publications Parues ou sous presse

1. **Guerfali M, Saidi A, Gargouri A, Belghith H.** Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Waste Paper for Ethanol Production Using Separate Saccharification and Fermentation. **Appl Biochem Biotechnol. 2015 Jan; 175(1):25-42. Epub 2014 Sep 20.**
2. **Ayadi W, Allaya N, Frikha H, Trigui E, Khabir A, Ghorbel A, Daoud J, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R.** Identification of a novel methylated gene in nasopharyngeal carcinoma: TTC40. **Biomed Res Int. 2014; 2014:691742. Epub 2014 Jun 30.**
3. **Ben Ayed D, Khabir A, Abid M, Bayrouti MI, Gargouri A, Sellami-Boudawara T, Mokdad-Gargouri R.** Clinicopathological and prognostic significance of p53, Ki-67, and Bcl-2 expression in Tunisian gastric adenocarcinomas. **Acta Histochem. 2014 Oct;116(8):1244-50. Epub 2014 Aug 3.**
4. **Jebali J, Fakhfekh E, Morgen M, Srairi-Abid N, Majdoub H, Gargouri A, El Ayeb M, Luis J, Marrakchi N, Sarray S.** Lebecin, a new C-type lectin like protein from Macrovipera lebetina venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. **Toxicon. 2014 Aug;86:16-27. Epub 2014 May 9.**
5. **Ben Hmad I, Abdeljalil S, Saibi W, Amouri B, Gargouri A.** Medium initial pH and carbon source stimulate differential alkaline cellulase time course production in Stachybotrys microspora. **Appl Biochem Biotechnol. 2014 Mar;172(5):2640-9. Epub 2014 Jan 14.**
6. **Abdelmaksoud-Dammak R, Miladi-Abdennadher I, Saadallah-Kallel A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M, Daoud J, Mokdad-Gargouri R.** Downregulation of WIF-1 and Wnt5a in patients with colorectal carcinoma: clinical significance. **Tumour Biol. 2014 Aug;35(8):7975-82. doi: 10.1007/s13277-014-2015-9. Epub 2014 May 16**
7. **Mihoubi Mohamed, Mihoubi Wafa, Gargouri Ali, Jarraya Raoudha.** Comparative study of the chemical composition and biological activities of the essential oils of Senecio gallicus from Tunisia**. Journal: Journal of Advances in Chemistry.Vol. 10, No. 8**
8. **Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Tokgoz H, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Morel-Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hézard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Proulle V, Meunier S, Négrier C, Nurden A, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg N, HadjKacem B, Heller PG, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F.** Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. **Hum Mutat. 2014 Sep;35(9):1033-45. Epub 2014 Jul 15.**

9. **Allaya N, Khabir A, Sallemi-Boudawara T, Sellami N, Daoud J, Ghorbel A, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R, Ayadi W.** Over-expression of miR-10b in NPC patients: correlation with LMP1 and Twist1. **Tumour Biol. 2015 Jan 20. [Epub ahead of print]**
10. **Abdelmaksoud-Damak R, Miladi-Abdennadher I, Triki M, Khabir A, Charfi S, Ayadi L, Frikha M, Sellami-Boudawara T, Mokdad-Gargouri R.** Expression and Mutation Pattern of β-Catenin and Adenomatous Polyposis Coli in Colorectal Cancer Patients. **Arch Med Res. 2015 Jan;46(1):54-62. Epub 2015 Feb 3.**
11. **Hanana Sabrine, Elloumi Ahmed, Placet Vincent, Tounsi Hajer, Belghith Hafedh, Bradai Chedly.** An efficient enzymatic-based process for the extraction of high-mechanical properties alfa fibres. **Industrial Crops and Products, Volume 70, August 2015, Pages 190-200**

II. Articles d'ouvrages scientifiques parus en 2014

0

III. Brevets d'invention déposés en 2014

1. **Zamen Ben Romdhane, Noomen Hadj Taïeb et Ali Gargouri.** Exopolysaccharide d'un champignon filamenteux Penicillium occitanis: production, extraction et caractérisation.

IV. Diplômes

IV.1. Habilitations : 0

IV.2. Thèses

1. **Ouafa Benzina:** Etude Biophysique de la Régénération de Neurones Périphériques. **Soutenue le 30 Janvier 2014 (Université Montpellier 2 en cotutelle avec L'Université de Sfax). (Encadreur : Pr. Mme Csilla GERGELY & Pr. Mr Ali Gargouri).**
2. **Salma Abdeljalil-Trabelsi:** Etudes moléculaires et biochimiques des cellulases et d'autres hydrolases chez une souche fongique locale Stachybotrys microspora. **Soutenue le 25 janvier 2014 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Pr. Mr Ali Gargouri).**
3. **Naourez Damak-Boujelben:** Pectate Lyase Et Rhamnogalacturonase Fongiques: Purification, Caractérisation et Expression Hétérologue. **Soutenue le 14 mars 2014 (École Nationale d'Ingénieurs de Sfax). (Encadreur : Pr. Mr Ali Gargouri).**
4. **Rania Abdelmaksoud-Dammak:** Investigation moléculaire des cancers colorectaux héréditaire et sporadique chez des patients du Sud Tunisien. **Soutenue le 27 Septembre 2014 (École Nationale d'Ingénieurs de Sfax). (Encadreur : Pr. Mme Raja Mokdad-Gargouri).**
5. **Zamen Ben Romdhane:** Régulation de la production des pectinases par le mutant CT1 de Penicillium occitanis et caractérisation de nouveaux polymères sécrétés. **Soutenue le 30**

/09/2014. (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Pr. Mr Ali Gargouri & Dr. Noomen Hadj-Taïeb)

IV3. Masters

1. ***Maha Bouzid: La lipase de Talaromyces thermophilus: Application dans la synthèse des sucro-esters et essai de son expression hétérologue. Soutenue le 25-11-2014 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Inès Belhaj Ben Romdhane).***
2. **Hamed Ammar:** Expression Hétérologue Du Peptide Antifongique Acafp Secreté Par Le Champignon Filamenteux Aspergillus clavatus. **Soutenue le 26 Novembre 2014 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Houda Skouri-Gargouri).**
3. **Ines Ayadi:** Levures oléagineuses: Isolement, caractérisation et production de lipides d'intérêt. **Soutenue le 27 novembre 2014 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Mohamed Guerfali).**
4. **Omama Kamoun:** Optimisation des conditions de production de lipides d'intérêts chez les champignons filamenteux oléagineux. **Soutenue le 28/11/2014 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Hèla Trigui-Lahiani).**
5. **Aicha Kriaa :** Impact de la surexpression de la thioredoxin reductase sur l'apoptose médiee par la protéine p53 chez la levure. **Soutenue le (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Yosra Kamoun & Ali gargouri).**

IV.4. Projets de Fin d'étude

1. **Dabbebi Bassma & Saidi Syrin :** Purification de la tyrosinase de l'encre de seiche Sepia officinalis. **Soutenu le (ISET Sfax). (Encadreur : Emna Ketata & Aref Neifer).**
2. **Maryem REBAI & Asma YAICH :** Purification, caractérisation biochimique d'une endoglucanase neutre d'un champignon local *Stachybotrys microspora* et application. **Soutenu le 28/05/2014 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Ines Ben Hmad et Ali Gargouri).**
3. **Nour Chamtouri :** Criblage d'une banque peptidique par « Phage Display » pour l'isolement de peptides antagonistes à l'oncoprotéine LMP1 de l'EBV. **Soutenu le 05 Juin 2014 (Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax ISBS). (Encadreur : Nihel Boukhris Ammous et Raja Mokdad Gargouri).**

V. Participation/Organisation d'évennements scientifiques (symposiums, congrès, séminaires, ateliers de travail,…).

V.1. Organisation

8. **25ème Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) du 24 au 27 Mars 2014, Hammamet (Tunisie) organisé par l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB).**

9. **Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2014) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) du 20 au 24 Décembre 2014, Hammamet (Tunisie)** organisé par **l'Association Tunisienne de Biotechnologie (ATB).**

V.2. Participations

V.2.1 Nationaux

1. **Atelier de formation sur la Fermentation** intitulé « De quelques fondamentaux…Vers la conduite de cultures en Bioreacteur » **du 02 au 05 Juin 2014 à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax** organisé par **ADRIC (Association du Développement de la Recherche, de l'Innovation et de l'Insertion des Compétences).**

V.2.2 Internationaux

1. **WORKSHOP Bio-composites "Les fibres de nouveaux challenges" Le 14-15-16 Mars à l'ile de Kerkennah, Le Grand Hôtel** organisé par **A2ME (Association Méditerranéenne des Matériaux et de l'Environnement).** Participation des **Mrs Mohamed Guerfali, Hafedth Belghith (**conférence : Application des enzymes dans le traitement des fibres**) et Ali Gargouri (**conférence : Production d'un bio polymère polysaccharidique secrété par un champignon).
2. **Conférence du 50 ème anniversaire de la découverte du virus de l'EBV organisé par l'Université de Birmingham- Londres- Grande-Bretagne du 23 au 25 Mars 2014.** Participation de **Wajdi Ayadi** par une Communication par poster intitulé **« Unmethylation of the EBV Latent Membrane Protein 1 promoter is characteristic of the juvenile form of nasopharyngeal carcinomas ».**
3. **La première conférence de l'oncologie médicale de Marrakech et la quatrième réunion annuelle de l'association du Moyen-Orient pour la recherche sur le cancer du 28 au 29 novembre 2014-Marrakech-Maro**c. Participation de **Raja Mokada-Gargouri** par une Présentation d'un travail récent intitulé **« Loss of WIF-1 and Wnt5a expression is related to aggressiveness of sporadic breast cancer in Tunisian patients ».**

VI. Participation à des stages de formation (indiquer le nom et la qualité du bénéficiaire, le sujet, le lieu et la durée du stage)

Stages:

1. **Mouna Triki :** Etudiant en thèse. Stage d'un mois, du 01/04/2014 au 30/04/2014 à l'équipe Signalisation Hormonale et Cancer au sein de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (INSERM U896) - FRANCE. (Budget : LVBPPE +Ecole Doctorale ENIS).
2. **Wafa Mihoubi :** Etudiant en thèse. Stage de quarante-sept jours (47) jours, du 08/06/2014 au 24/07/2014 au laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire- Université de Versailles-Paris- FRANCE. (Budget : LVBPPE)

3. **Nesrine Allaya :** Etudiant en thèse. Stage de vingt-sept jours (27) jours, du 15/06/2014 au 11/07/2014 à l'UMR 8126- Institut de Cancérologie Gustave Roussy- Paris- FRANCE. (Budget : LVBPPE+ Centre National de la recherche scientifique– FRANCE (CNRS)).
4. **Nihel Ammous-Boukriss:** Etudiante en thèse. Stage de vingt-six (26) jours, du 08/09/2014 au 03/10/2014 au groupe Ciblage et Auto-Assemblages Fonctionnels dans l'équipe ICMV de L'UMR 6226- Université de Rennes 1- FRANCE. (Budget : Projet (PHC–UTIQUE) 2013 codé 13G 0805+Université de Rennes 1).
5. **Nihel Ammous-Boukriss:** Etudiante en thèse. Stage de vingt-six (46) jours, du 13/10/2014 au 27/11/2014 au groupe Ciblage et Auto-Assemblages Fonctionnels dans l'équipe ICMV de L'UMR 6226- Université de Rennes 1- FRANCE. (Budget : LVBPPE+Université de Rennes 1).
6. **Bilal Kerouaz :** Etudiant en thèse au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée-Département de Biochimie- Université Badji Mokhtar- Annaba- ALGERIE. Stage d'un mois et demi du 15/11/2014 au 31/12/2014 (Budget : Projet Algérien).

Missions:

1. **Ali Gargouri :** Professeur et chef de labo. Mission de cinq (05) jours du 27/01/2014 au 31/01/2014 à l'Equipe de Bionanophotonique, L2C UMR 5221 CNRS-Université Montpellier 2 - FRANCE (Budget : LVBPPE).
2. **Raja Mokada-Gargouri :** Professeur. Mission de six (06) jours du 02/02/2014 au 07/02/2014 à l'équipe ICMV de L'UMR 6226- Université de Rennes 1- FRANCE. (Budget : Projet (PHC–UTIQUE) 2013 codé 13G 0805).
3. **Wajdi Ayadi :** Maître Assistant. Mission de Six (03) jours du 23/03/2014 au 26/03/2014 au collège Keble à oxford pour assister à la conférence du 50 ème anniversaire de la découverte du virus de l'EBV organisé par l'Université de Birmingham- Londres- Grande-Bretagne du 23 au 25 Mars 2014.. (Budget : L'inviteur (Université de Birmingham) +LVBPPE).
4. **Amor Mosbah :** Maître Assistant à l'équipe ICMV de L'UMR 6226- Université de Rennes 1- FRANCE. Mission de six (05) jours du 17/03/2014 au 21/03/2014 (Budget : Projet (PHC–UTIQUE) 2013 codé 13G 0805).
5. **Ali Gargouri :** Professeur et chef de labo. Mission de cinq (03) jours du 07/09/2014 au 09/09/2014 à l'Université de Rouen- FRANCE (Budget : L'inviteur (Agilent technologies, INC) + LVBPPE).
6. **Wajdi Ayadi :** Maître Assistant. Mission de Six (06) jours du 30/11/2014 au 05/12/2014 à l'UMR 8126- Institut de Cancérologie Gustave Roussy- Paris- FRANCE. (Budget : Projet (DGRS/CNRS) 2014 codé 14/R0801).
7. **Pierre Busson :** Directeur de recherche au CNRS (DR2)-UMR 8126- Institut de Cancérologie Gustave Roussy- Paris- France. Mission de quatre (04) jours du 06/11/2014 au 09/11/2014 (Budget : Projet (DGRS/CNRS) 2014 codé 14/R0801).
8. **Ali Gargouri :** Professeur et chef de labo. Mission de trois (03) jours du 06/12/2014 au 08/12/2014 au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée-Département de Biochimie- Université Badji Mokhtar- Annaba- ALGERIE. (Budget : Projet Algérien).

9. **Hafedh Belguith :** Professeur. Mission de trois (03) jours du 06/12/2014 au 08/12/2014 au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée-Département de Biochimie-Université Badji Mokhtar- Annaba- ALGERIE. (Budget : Projet Algérien).
10. **Mohamed Guerfali :** Maître Assistant. Mission de trois (03) jours du 06/12/2014 au 08/12/2014 au Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie Appliquée-Département de Biochimie- Université Badji Mokhtar- Annaba- ALGERIE. (Budget : Projet Algérien).
11. **Raja Mokada-Gargouri :** Professeur. Mission de six (04) jours du 27/11/2014 au 30/11/2014. Participation à la première conférence de l'oncologie médicale de Marrakech et la quatrième réunion annuelle de l'association du Moyen-Orient pour la recherche sur le cancer du 28 au 29 novembre 2014-Marrakech-Maroc (Budget : LVBPPE).
12. **Ali Gargouri :** Professeur et chef de labo. Mission de six (06) jours du 10/12/2014 au 15/12/2014 à l'Equipe de recherche Interactions Firmicutes-environnements (IFe) de l'unité MICALIS- Centre de Recherche INRA (Centre National de la Recherche Agronomique)-Paris- France. (Budget : Projet (PHC–UTIQUE) 2014 codé 14G 0816).
13. **Moez Rhimi :** Chargé de Recherche 2e classe (CR2) à l'INRA- Institut Micalis - l'Equipe de recherche Interactions Firmicutes et environnements (IFe). Mission de douze (12) jours du 20/12/2014 au 31/12/2014 (Budget : Projet (PHC–UTIQUE) 2014 codé 14G 0816).

VI- Projets de coopération

VI.1. Nationaux : 0

VI.2. Internationaux

1. Renouvellement du Projet de recherche dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso – Française pour l'année 2013 (PHC-Utique) pour l'année 2014 intitulé " Identification et synthèse de peptides ciblant l'oncoprotéine LMPI du virus d'Epstein Barr approche thérapeutique aux pathologies malignes associées à l'EBV " et sous le code 13G 0805.

2. Projet de recherche dans le cadre de la coopération scientifique Tuniso – Française pour l'année 2014 (DGRS/CNRS) intitulé " Etude fonctionnelle du gène TTC 40 dans le cancer du nasopharynx " et sous le code 14/R0801.

3. Projet de recherche dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso – Française pour l'année 2014 (PHC-Utique) intitulé " Rôle des serpins, inhibiteurs de protéases à serine, du microbiote digestif humain dans les maladies inflammatoires intestinales " et sous le code 14G 0816.

Préambule

Cette année peut être considérée comme phase de transition entre la fin d'un contrat et le démarrage d'un autre. Certaines voies de recherches ont été abandonnées ou mise en veilleuse, d'autres continuent et d'autres sont nouvelles. Parmi ces dernières, nous pouvons citer l'isolement de levures et champignons oléagineux en vue de produire des lipides microbiens qui pourraient être appliqués dans différents secteurs dont le biodiesel.

Nous avons enregistré la soutenance de cinq (05) thèses et de cinq (05) masters dont trois se poursuivent actuellement en thèse.

Sur le plan projets de recherche, nous avons obtenu la reconduction de 4 projets de collaboration bilatérale (03 avec la France et un avec l'Algérie). Nous avons déposé deux nouveaux projets CMCU mais qui n'ont pas été acceptés.

Sur le plan ouverture sur le monde extérieur (industriel et académique), certaines tentatives ont été démarrées et bien réussies avec le monde industriel mais qui n'ont pas encore été concrétisées sous forme de contrat ou de transfert réel. De plus, une solide collaboration a été entamée avec des collègues « non biologistes » de l'Université de SFax. Nous pouvons brièvement citer les actions suivantes :

-Essai de panification chez un boulanger en utilisant le jus brut de la souche A19 cultivé sur cellulose. Les résultats montrent que les pains produits avec notre jus enzymatique sont de qualité comparable à celle des pains obtenus par les améliorants commerciaux avec une mie moins collante et plus aérée. Cependant, ceci nous a permis de nous rendre compte de deux points importants : améliorer le niveau de production des enzymes par notre souche (et pourquoi pas tester la souche sauvage N1 et d'autres souches, ou encore produire les enzymes sur son de blé et non pas sur cellulose), avoir un certificat de l'innocuité de notre souche, un problème récurrent.

-Essai avec un agriculteur producteur de tomates cerise sous serre en utilisant les spores de notre souche P1 de *Beauveria bassiana* en tant que biopesticide et ce, dans le but de lutter contre la mineuse de la tomate. L'essai est préliminaire et partiellement réussi : faute de quantité suffisante en spores, nous n'avions fait qu'une seule pulvérisation de spores mais le responsable était pleinement satisfait. Ceci nous a permis de nous rendre compte qu'il faudra mettre une méthode, différente de celle que nous pratiquons au laboratoire habituellement, de production des spores en masse afin de subvenir aux besoins industriels. A titre d'exemple, il faut en moyenne 10^{13} spores par hectare traité.

-Nous avons repris nos travaux de collaboration avec l'Institut de l'Olivier de Sfax en utilisant les pectinases du mutant CT1 afin d'améliorer la quantité et la qualité d'huile obtenue et, surtout, de voir l'impact de l'ajout des enzymes au cours de la conservation des huiles et ce, en vérifiant les caractéristiques de l'huile après des mois de stockage, en la comparant avec l'huile obtenue par les voies classiques.

-Essais fructueux et collaboration intéressante avec les confrères physiciens et chimistes qui s'est consolidée par le co-encadrement d'au moins trois doctorants physiciens et une chimiste et ce, en apportant notre savoir faire et nos enzymes dans l'extraction le prétraitement des fibres végétales en vue de faire des biocomposites ou des nanofibres respectivement. Un article vient d'être publié conjointement avec nos confrères du génie mécanique de l'ENIS. Dans ce papier, nous montrons que les pectinases de la souche CT1, suives des xylanases de la souche AX4, ont permis d'avoir les meilleures fibres en terme de longueur de fibres et de propriétés mécaniques.

- Nous avons aussi démarré une collaboration avec des industriels du secteur du papier, en particulier la société Tunisie Ouate, afin de trouver des solutions biologiques dans le traitement/valorisation de la boue rejetée par cette usine, très riche en cellulose et en minéraux.

Dans ce qui suit, nous développons l'avancement des différentes recherches que nous menons :

Endoglucanases fongiques : Production, purification, caractérisation biochimique et application

Les endoglucanases se classent parmi les carbohydrates hydrolases. Elles initient la dégradation des fibres de cellulose à travers l'hydrolyse aléatoire des liaisons osidiques de type β-(1.4) dans la zone amorphe des fibres de la cellulose. C'est une classe d'enzymes cellulolytiques très importante sur le plan appliqué puisqu'elles sont impliquées dans la dégradation de la matière cellulosique.

Nous disposons en fait d'une souche locale fongique qui secrète des endoglucanases capables d'agir à pH neutre et basique, une qualité très rare dans le monde fongique et très recherchée dans les industries de la détergence et le délavage.

Lors de travaux antérieurs, nous avons entrepris d'établir les conditions de production et de révélation des activités endoglucanases, sécrétées par notre souche. Nous avons trouvé des résultats intéressants relatifs à l'effet du pH sur cette production. En effet, nous avons révélé une activité endoglucanase alkaline sur glucose uniquement à pH 8.

Nous avons produit des cellulases par fermentation en fed bach en utilisant un fermenteur de 20 litres, inoculé par 1% de cellulose avicel. La production d'enzymes était améliorée.

Par la suite, nous avons entamé un programme de purification de deux endoglucanases, agissant à pH neutre et basique. Plusieurs étapes chromatographiques ont été appliquées aboutissant à la purification à homogénéité de la première enzyme nommée EG1 et la deuxième nommée EG2. Notons qu'EG1 est non retenue sur une colonne échangeuse anionique FPLC Mono Q alors qu'EG2 est retenue dans la fraction éluée à 0.5 M NaCl de la même colonne à pH8. EG1 est retenue sur colonne MONOS à pH5. Elles auraient donc une composition en acides aminés très différente. Dans ce qui suit, nous résumons certaines de leurs propriétés biochimiques :

EG1 et EG2 ont une température optimale de 50°C et elles gardent à 60°C une activité relative de 80% et 90% respectivement. EG1 est plus active aux températures 30 et 40°C. EG1 est stable pendant 8h à 50°C alors qu'EG2 n'est stable que pendant 1h dans la même condition.

EG1 et EG2 ont un pH optimum égal à 7. EG1 est plus active à pH 9. Les deux enzymes purifiées sont stables sur une large gamme de pH allant de 5 à 9 et 4 à 10 respectivement. Ces deux cellulases sont neutres et alcali-tolérantes.

EG1 et EG2 sont plus actives sur le β-glucan d'orge que sur le carboxyméthyl-cellulose (CMC). Elles peuvent donc cliver aussi bien les liaisons beta 1,4 (CMC) que 1,3 (β-glucan). Elle serait donc propice pour certaines applications alimentaires.

EG1 et EG2 sont halophiles : elles sont activées en présence de NaCl avec un optimum à 5M et 0.8M respectivement. Nous comprenons par là qu'EG1 serait propice pour des applications dans le domaine des textiles et des lessives

La particularité d'EG1 c'est qu'elle résiste en présence des détergents ioniques et non ioniques ; notamment elle résiste bien à la présence du SDS 10% avec une activité résiduelle de 75% alors qu'EG2 est inactivée en présence de 0.1% SDS.

EG1 et EG2 sont stables pendant 4h à températures ambiantes (16°C) en présence de 25% de solvants organiques.

La chromatographie sur couche mince et la HPLC de la cinétique des produits d'hydrolyse de CMC par EG1 et EG2 montrent qu'EG1 produit essentiellement du cellobiose et du cellotriose alors qu'EG2 produit du cellobiose et du glucose.

Vue leurs propriétés, les deux endoglucanases purifiées auraient un intérêt biotechnologique surtout dans le délavage de jeans et dans la composition des détergents commerciaux.

Production, purification, caractérisation biochimique et moléculaire de cellulases et d'hémicellulases de champignons thermophiles.

Les champignons thermophiles sont des micro-organismes qui se développent à proximité des sources chaudes et/ou sur une masse entassée de matériel végétal (compost), sur des produits forestiers et autres accumulations de matières organiques.

Les champignons thermophiles sont sources d'enzymes thermostables qui permettent une amélioration de l'efficience industrielle : les enzymes extraites de micro-organismes, végétaux et animaux peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques de façon très efficace et spécifique.

La stratégie de fermentation et la nature de la source de carbone semble être d'une importance capitale aussi bien pour la production des β-glucosidases que pour la croissance.

Dans un premier volet, nous avons réalisé des fermentations de la souche AX4 en milieu liquide (SmF) tout en étudiant à chaque fois la source de carbone, source d'azote etc.., L'activité enzymatique (β-glucosidase) s'est avérée fortement réprimée par le glucose. Cependant, le lactose s'est montré comme étant le meilleur substrat carboné, après le son de blé, inducteur des β-glucosidases de la souche AX4.

Dans un deuxièmes volet et dans le but de produire d'une façon efficiente les β-glucosidases par AX4, nous avons réalisé deux fermentations à large échelle dans un fermenteur de 3,6 L en batch. Dans la première nous avons utilisé le lactose comme source de carbone alors que dans la deuxième on s'est servi d'un mélange de son de blé et de lactose. Nous avons appliqués pour chacune de ces deux fermentations les conditions de culture déjà optimisés par Erlenmeyers. Au cours de ces deux fermentations nous avons déterminé la production des β-glucosidases ainsi que les concentrations des protéines extracellulaires et du lactose. Ces deux fermentations ont montré un rendement nettement meilleur par rapport à ceux réalisées en Erlenenmeyer. Par ailleurs nous comptons améliorer davantage ces rendements en réalisant d'autres fermentations en fed-batch.

La β-glucosidase produite par cette souche a été purifiée (suite à une précipitation fractionnée à l'acétone) par une série de méthodes chromatographiques impliquant une étape de gel filtration sur S200, une chromatographie échangeuse anionique sur colonne Q-sépharose (big beads) et enfin une Mono Q par FPLC. Cette β-glucosidase purifiée est monomérique de masse moléculaire de 116 KDa déterminée par SDS PAGE. La protéine purifiée est très stable sur une large gamme de pH et présente un pH optimum de 5. La température optimale de l'activité β-glucosidase est de 65°C; associée à une excellente thermostabilité à 60°C. Cette caractéristique est très recherchée par les industriels, dans le sens où elle implique le rabattement du coût du procédé. La β-glucosidase purifiée est légèrement activée en présence du cobalt, du zinc, du calcium, du magnésium et du manganèse mais elle se trouve fortement inhibée en présence des ions Fe^{2+} et Cu^{2+}. Les applications

potentielles des β-glucosidases dans plusieurs domaines ne cessent d'augmenter et plusieurs de ces enzymes sont en utilisation commerciale.

Cette β-glucosidase possède des propriétés intéressantes en termes de la thermoactivité et de la thermostabilité qui la distinguent des autres enzymes.

Nous avons par la suite immobilisé et caractérisé biochimiquement cette β-glucosidase. Par la suite, nous avons appliqué la β-glucosidase libre et immobilisée de *Talaromyces thermophilus* dans l'amélioration de l'hydrolyse de la matière lignocellulosique (papier) par les cellulases de *Trichoderma reseei* et les hémicellulases/cellulases de *Talaromyces thermophilus.* Le jus de l'hydrolysat à été transformé en bioéthanol par Fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* .

Dans un troisième volet de sa thèse, nous avons optimisé les paramètres de production des β-glucosidases et xylanases par une souche de champignon thermophile soumise à des fermentations rentables comme la fermentation en milieu solide (SSF). Cette SSF a été réalisée dans le but d'avoir une productivité élevée et moins de contamination. Tout ceci encourage l'industrie à utiliser ce genre d'enzyme cellulolytique et hémicellulolytique, en raison de son investissement minime et des faibles coûts d'exploitation. La SSF est définie comme un procédé de fermentation dans lequel les micro-organismes croissent sur des matières solides hors de la présence de liquide libre et l'humidité nécessaire à la croissance microbienne qui existe à l'état adsorbé ou complexé avec la matrice solide.

Les caractéristiques physico-chimiques, cristallinité, la porosité du substrat, volume de substrat et la surface spécifique, pourraient être vitaux pour l'induction de système enzymatique cellulolytique dans les cultures fongiques. Ces paramètres peuvent en outre être utilisés comme référence dans des processus de production commerciale dans des conditions de SSF.

Nous envisageons le clonage de la totalité du gène, l'expression hétérologue de la β-glucosidase chez *E.coli*, afin de mener sa cristallisation et ainsi afin d'étudier les différentes entités intervenant dans la thermostabilité de cette enzyme.

Etude d'une beta glucosidase fongique hyperglycosilée :

Aujourd'hui, les biocatalyseurs deviennent l'un des métabolites plus importants nécessaires dans diverses applications biotechnologiques. Le dépistage de nouvelles souches productrices de l'enzyme est donc une nécessité mise à jour. Après le criblage d'une douzaine de souches, une souche de *Fusarium solani* a été choisie pour son rendement élevé de l'activité β-glucosidase. Les effets de certains facteurs sur la production β-glucosidase ont été étudiés, y compris: pH initial, la composition du milieu, la concentration des sources de carbone et d'azote et enfin la taille de particule des substrats bruts. Le pH optimal pour la production d'enzyme était de 4. L'activité β-glucosidase la plus élevée a été produite sur des sources de carbone bruts, avec une concentration de 4% de son de blé étant le meilleur pour atteindre une 5 U ml-1. Fait intéressant, nous avons trouvé une corrélation positive entre la taille des particules de son de blé et le niveau de production β-glucosidase. Par ailleurs, 13.60 U ml-1 a été produit en utilisant 0.5% de sulfate d'ammonium comme source d'azote.

Cette enzyme s'est avérée hyperglycosilée, avec une taille supérieure à 700kDa. La déglycosilation par endoH la rend inactive.

L'activité β-glucosidase a été appliquée avec succès dans la bioconversion de l'oleuropéine. En effet, 82,5% de l'oleuropéine a été déglycosylé après une heure à 40 ° C. Cette beta glucosidase

a été purifiée et a été testée dans l'hydrolyse d'autres glycosides : amygdaline, esculine, salicine, arbutine, le safran. Elles ont toutes été hydrolysées en libérant le glucose et l'aglycone.

Purification, expression hétérologue et applications des pectinases fongiques

Traditionnellement, les protéines d'intérêt industriel étaient extraites directement des organismes qui les synthétisent, mais devant une demande sans cesse croissante, il a fallu développer de nouvelles sources de production. Avec l'avènement du génie génétique, qui permet d'introduire et d'exprimer un gène étranger (ou transgène) dans un organisme hôte, la synthèse de protéines recombinantes dans des systèmes hétérologues est désormais possible. Parmi les organismes les utilisés, on retrouve les bactéries, les levures, les champignons et enfin les cellules végétales et animales.

L'apport important des enzymes dans le domaine industriel n'est plus à démontrer. En effet, l'utilisation des enzymes dans l'industrie agroalimentaire, remplace peu à peu les procédés chimiques. Les procédés enzymatiques sont moins polluants, plus faciles à mettre en œuvre avec une spécificité d'action vis-à-vis du substrat.

Les enzymes pectinolytiques présentent un intérêt industriel pour certaines applications agroalimentaires essentiellement dans l'extraction et la clarification de certains jus de fruits ainsi que dans l'extraction des huiles végétales telle que l'huile d'olive. Elles sont même employées dans l'industrie textile dans l'élimination des produits résineux du tissu avant sa teinture.

Parmi les techniques d'amélioration de la production enzymatique est la sélection de souches hyper-productrices de pectinases. En effet un mutant CT1 a été isolé, au Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes du Centre de Biotechnologie de Sfax (LGME-CBS), à partir de la souche sauvage CL100 de *Penicillium occitanis* après un seul tour de mutagenèse à l'acide nitreux. Ce mutant sur-exprime les pectinases constitutivement. Cependant, ce mutant surexprime un ensemble de pectinases alors que certaines applications biotechnologiques requièrent une seule activité pectinolytique. Pour ce faire, une autre technique, qui pourrait améliorer la production ou la purification d'une pectinase, consiste en l'expression du gène codant pour cette enzyme dans un système hétérologue.

L'objectif principal de ce travail est d'exprimer les gènes codant pour deux pectinases ayant des intérêts en agroalimentaire, en l'occurrence une pectine lyase et une polygalacturonase de *P. occitanis* dans des systèmes d'expression procaryote (E. coli) ou eucaryote (levures et champignon filamenteux).

Cette étude a commencé par l'amplification et l'insertion de la forme mature (forme dépourvue de son peptide signal) d'une pectine lyase dans les deux différents vecteurs d'expression (pET-21a : production intracellulaire et pET-22b : production péri-plasmique) afin d'étudier la sécrétion de cette protéine par la séquence signale pelb porté par le vecteur pET22b et tester son activité. Ces deux constructions ont servi pour transformer la souche BL21 *d'E. coli*. Une étape d'optimisation des conditions de production des protéines hétérologues a été entamée.

Nous poursuivons ce travail afin de réussir la plupart des expressions hétérologues escomptées, comparer les performances des enzymes recombinantes avec les enzymes natives purifiés et enfin, dans la mesure du possible, appliquer ces enzymes recombinantes dans des secteurs industriels appropriés.

Dans la partie biochimique, nous avons entamé la purification et la caractérisation d'une seconde polygalacturonase du mutant CT1 de *Penicillium occitanis* après une seule étape sur colonne Mono Q-Sépharose. Le séquençage du coté N-terminale a été réussi et a effectivement montré que cette pectinase est différente de la première et correspond à un second gène de *P.*

occitanis. La caractérisation biochimique montra des différences notables entre les deux polygalacturonases déjà purifiées, en termes d'activité spécifique, de thermoactivité, exigence en ions, influence des effecteurs, etc…

En plus nous avons appliqué ces deux polygalacturonase, ainsi que l'extrait total dans la clarification des jus (citron et datte) et nous avons obtenu des résultats encourageants.

Utilisation des enzymes pectinolytiques dans l'amélioration du rendement et de la qualité de l'huile d'olive

Aujourd'hui la biotechnologie cherche à utiliser les connaissances des sciences biologiques dans différents secteurs aussi bien industriels, agronomiques, pharmaceutiques, médicaux, voire même sociaux. Elle repose essentiellement sur les enzymes, ces catalyseurs biologiques qui, grâce à leurs propriétés performantes, remplacent peu à peu les catalyseurs chimiques pour obtenir ainsi des produits souvent améliorés avec moins de pertes, moins de pollution et une vitesse importante. Les pectinases, enzymes très importantes dans le secteur agroalimentaire, sont classées selon leur mode d'attaque sur le squelette galacturonane de la molécule de pectine.

Les enzymes les plus connues sont les pectine-methyl-estérases, les dépolymérases qui regroupent les hydrolases et les lyases et enfin les enzymes débranchantes. Elles sont potentiellement utilisées dans diverses applications telles que l'extraction et la clarification des jus de fruits, l'extraction des huiles végétales (huiles d'olives) et dans la protoplastisation des cellules végétales. En effet l''huile d'olive constitue un secteur majeur de l'économie tunisienne et c'est le premier produit agricole exporté. Ainsi l'amélioration de la qualité d'huile d'olive devient plus que jamais nécessaire à fin d'assurer un produit concurrentiel vis-à-vis des autres huiles végétales ainsi que vis-à-vis des huiles d'olives des autres pays producteurs.

Dans ce contexte ce travail s'implique, par l'ajout des enzymes pectinolytiques acides et basiques et combinaison des deux enzymes lors du malaxage de la pate d'olive (olive variété « Chemlali » verte et noire) afin d'améliorer le rendement d'extraction d'huile d'olive et son critère de qualité et de pureté. Et aussi étudier des caractéristiques physicochimiques de l'huile d'olive lors du stockage en fonction du temps (temps 0 ; 3 mois ; 6 mois et 12 mois).

Au temps zéro, l'ajout des enzymes pectinolytiques acide et basique lors du malaxage de la pâte d'olive a permis :

- L'amélioration du rendement en huile de l'ordre de 1,5 % à 2%, soit 7 à 10% sur la masse d'huile.
- L'augmentation du taux de l'enzyme acide de 2x double le rendement, alors que 4x plus d'enzymes n'améliore pas le rendement.
- L'amélioration de la qualité de l'huile d'olive particulièrement en antioxydants à savoir:
    - Les polyphénols ont augmenté de 15 %
    - Les chlorophylles ont augmenté de 16% (oive verte) et 18% (olive noire)
    - Les carotènes ont augmenté de 30% (olive verte), 40% (olive noire)
    - Diminution de l'extinction spécifique donc de l'oxydation

Isolement de levures oléagineuses et production de lipides microbiens

Les huiles microbiennes, appelées aussi huiles unicellulaires, sont produites par certains micro-organismes oléagineux, tel que les levures, les champignons, les bactéries et les micro-algues. Les micro-organismes qui stockent plus que 20% de lipides sont considérés comme

oléagineux. Parmi 1500 espèces de levures connues jusqu'à maintenant, seulement 5% d'entre elles sont connues comme oléagineuses. Les lipides microbiens sont constitués habituellement de 80-90% de triglycérides (TAG) avec une composition en acides gras semblable à beaucoup d'huiles de plantes. La production des lipides microbiens présente de nombreux avantages. Ces microorganismes ont un cycle de vie court par rapport aux plantes de sorte que la récolte est plus rapide, il exige moins de main-d'œuvre, nécessite moins d'espace pour la culture, ne dépend ni de saison ni du climat. Les levures, étant unicellulaires, prêtes à l'amélioration génétique et à la fermentation à grande échelle, possèdent des critères attirant pour le développement d'approches biotechnologiques. Les levures oléagineuses semblent être les meilleurs candidats à cet effet. En outre, les levures peuvent croître sur une matière première peu coûteuse telle que les résidus alimentaires, agricoles et industriels, abaissant ainsi le coût de la production d'huiles. Lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions limitées en azote, les levures ont la capacité d'accumuler l'huile jusqu'à 72% de leur poids sec. Parmi les levures oléagineuses, les souches du genre *Yarrowia, Candida, Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus, Trichosporon et Lipomyces* ont été étudiées pour leurs propriétés pétrolières microbiennes.

Dans ce contexte, un criblage de nouvelles souches de levures oléagineuses a été réalisé à partir de différents biotopes (sol, produit laitiers, grignon d'olive, eaux usées, graines, fruits…). La mise en évidence des lipides mettait en jeu deux types de réactifs spécifiques des corps gras intracellulaires, marquage colorimétrique par le Noir de Soudan et marquage fluorométrique par le Rouge de Nil, voir un exemple à la figure 1.

La levure YE4, a été sélectionnée pour son pouvoir oléagineux et aussi pour sa capacité à assimiler le xylose et à son pouvoir lipolytique. Nous avons étudié l'effet de différents facteurs sur la croissance de la souche YE4 ainsi que la production des lipides. Les optima de pH et de température sont de l'ordre de 6.0 et 30°C respectivement. Concernant la source d'azote, la combinaison extrait de levure/peptone à une concentration 0.16 g/L d'azote conduit à un meilleur taux d'accumulation de lipides qui atteint 26.9% avec une matière sèche de 13.13 g/L.

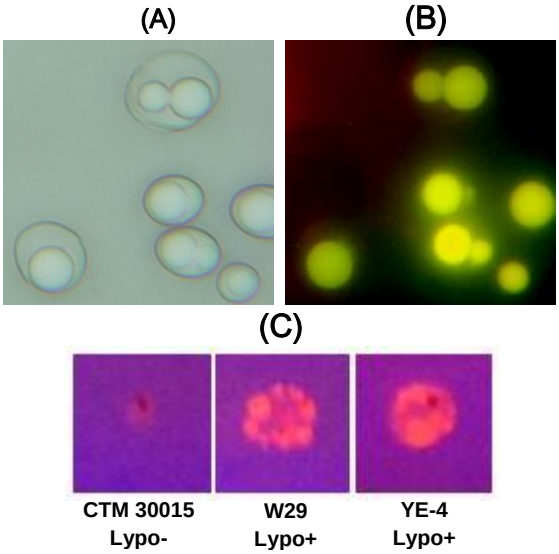


Figure 1. (A) Observation microscopique (Gx100) des cellules de la souche YE4 à la lumière blanche, (B) Marquage fluorométrique des corps gras intracellulaires par le fluorochrome rouge de Nil, (C) Détection d'activité lipolytique sur milieu solide + Rhodamine (La souche W29 de *Yarrowia lipolytica* et la souche CTM 30015 de *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées comme témoin positif et négatif, respectivement, de l'activité lipase).

La combinaison glucose/xylose (2 :1) donne la plus haute teneur en lipides 32.72% avec une matière sèche de 13.08 g/L. En utilisant un rapport C/N 200, la souche YE4 produit une matière sèche de l'ordre de 15.44 g/L contenant environ 6 g/L de lipide, correspondant à 38.47% de taux d'accumulation. En fermenteur, la souche YE4 accumule 7.8 g/L des lipides correspondant à 35.4% de matière sèche. La caractérisation qualitative des lipides issus de la culture de la levure YE4 par CCM a montré sa richesse en triglycérides (TAG). Une analyse par chromatographie en phase gazeuse montre que la souche YE4 possède un profil lipidique composé majoritairement d'acides oléique C18:1 (63%) suivi de l'acide palmitique C16:0 (15%). Des études de valorisation des déchets issus des industries oléicoles et agroalimentaires sont entamées et ce, par culture de levures oléagineuses nouvellement isolées telles que (*Rhodotorula mucilaginosa* YMG1, *Trichosporon asahii* YD1, *Trichosporon cutaneium* 30125, *Yarrovia lipolytica* YSO1 et *Candida viswanathii* YE4). Les produits d'hydrolyse de la matière lignocellulosique enrichis en sucres fermentescibles représentent une sérieuse alternative pour la production des lipides microbiens par un bioprocédé rentable économiquement.

Isolement de champignons filamenteux oléagineux et production de lipides microbiens

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'accumulation des lipides d'intérêt chez des espèces fongiques. En effet, certains microorganismes présentent la capacité d'accumuler des quantités significatives d'huiles, jusqu'à parfois 70 % de leur poids sec dans des conditions particulières de culture. Il s'agit donc de comprendre les mécanismes de synthèse et d'accumulation des huiles chez les champignons oléagineux afin d'augmenter leur teneur en lipides ou produire des acylglycérols de composition prédéfinie, d'une valeur ajoutée et d'un intérêt biotechnologique. Le profil et la quantité de lipides produits dépendent de la souche, de la nature du substrat, des conditions opératoires et du mode de conduite de la culture.

Dans une première étape nous avons réalisé un criblage qualitatif, grâce au Noir de Soudan et au Rouge de Nil, des champignons isolés à partir de différents biotopes. Cette étape a permis de sélectionner deux souches fongiques CO8 et E4-2 dont l'identification moléculaire a révélé qu'il s'agit respectivement de *Mucor circinelloides* et de *Fusarium verticillioides*.

La seconde étape consiste à orienter les conditions de culture des champignons isolés vers une meilleure production des lipides d'intérêt. Pour ce faire, plusieurs paramètres influençant la production de lipides ont été étudiés à savoir la source d'azote, la source de carbone et le rapport C/N. Le maximum de production de lipides (36% et 46% pour CO8 et E4-2 respectivement) est obtenu lorsque les deux souches sont cultivées sur milieu contenant le glucose comme source de carbone, une limitation en source d'azote avec une quantité d'azote égale à 0,126 g/l et un rapport C/N supérieur ou égal à 60. Les teneurs en lipides des deux souches augmentent avec le temps jusqu'à atteindre un maximum au 9ème jour de croissance.

Les lipides accumulés par CO8 et E4-2 ont été analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse. Les lipides accumulés par les deux souches sont très comparables. Ils sont constitués majoritairement de triglycérides, mais ils renferment également des acides gras libres. L'analyse par CPG des lipides accumulés, montre que les deux souches étudiées produisent majoritairement de l'acide oléique, l'acide linoléique et l'acide palmitique.

Expression hétérologue du peptide antifongique « AcAFP » chez *E. coli*

Le travail réalisé, a pour objectif la mise au point d'un système d'expression et de purification de l'AcAFP recombinant, en vue d'une étude des relations structure – fonction de ce peptide. Ces travaux ont commencé par l'amplification et l'insertion des trois formes peptidiques du gène *acafp* à savoir la forme totale (pré-pro), la forme large et la forme mature, tout d'abord dans le vecteur de clonage pCR2.1 cloné dans la souche *E.coli* Top10. Par la suite, les constructions recombinantes vérifiées par séquençage nucléotidique et par PCR ont subi une double digestion par les deux enzymes de restriction *BamHI* et *XhoI*. Les inserts obtenus, ont été purifiés introduits dans le vecteur d'expression pET21-a(+) préalablement déphosphorylé. Les plasmides recombinants obtenus (pET21-a(+)/*acafp*) ont servi par la suite pour la transformation de la souche BL21 d'*E.coli*. Trois clones recombinants nommés BL1.8, BL2.7 et BL3.2 sur-exprimant respectivement le gène *acafp* forme pré-pro (totale), forme large et forme mature dans le vecteur d'expression pET21-a(+) ont été sélectionné.

La seconde partie du travail, s'est focalisée à explorer les différents paramètres qui permettent d'optimiser la production et la quantité de la protéine hétérologue. Pour ce faire, nous avons varié certains facteurs qui peuvent affecter l'étape de la croissance cellulaire tel que la composition du milieu de culture (milieu LB et 2YT), ou bien la phase d'induction tels que la concentration de l'inducteur IPTG (0,5mM, 1mM et 2mM), le temps d'induction (3 heures et 18 heures) et la température de l'induction (30°C, 37°C et température ambiante). Le meilleur niveau de production du peptide AcAFP recombinant a été observé sur milieu 2YT, avec une induction durant toute une nuit à 23°C et en présence de 1 mM d'IPTG.

L'analyse des extraits protéiques obtenus sur gel de poly-acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et l'immunodétection par Western-Blot en utilisant l'anticorps anti AcAFP nous a permit de confirmer la production des trois formes peptidiques exprimées dans les extraits protéiques totaux. Les résultats préliminaires montrent la présence de la forme mature aussi bien dans la fraction soluble que sous forme précipitée au niveau des corps d'inclusion et qu'elle est absente de la fraction extra-cellulaire. Contrairement à la forme pré-pro, qui semble pouvoir se faire sécréter dans le compartiment extracellulaire par son propre peptide signal. Il est intéressent de signaler que le peptide recombinant AcAFP exprimé est fusionné à une séquence His_6-tag à son extrémité C-terminale, ce qui nous a permis de le purifier par chromatographie d'affinité sur colonne fixant le Ni^{2+}-NAT-agarose. Nous avons donc réussi à purifier une protéine ayant une taille d'environ 6 kDa ce qui correspond à la taille prédite pour l'AcAFP natif secrété par *Aspergillus clavatus*. Les principaux axes envisagés pour la suite de notre travail seront focalisés sur :

- Production des mutants structuraux via l'expression de gènes artificiels pour la production des formes peptidiques modifiés de l'AcAFP : forme dépourvue du CBD, de la séquence N-terminale.
- Etude comparative des caractéristiques biochimiques et structurales entre les différentes formes peptidiques recombinantes et le peptide natif.
- Etude des relations structure-fonction afin de relier la variabilité de la séquence/structure avec l'activité antifongique nouvellement exprimée.

Recherche de molécules chimiques inhibitrices de la tyrosinase :

Nous avons déjà montré que l'encre de seiche renferme deux activités enzymatiques assez importantes : une tyrosinase et une proxydase. Nous avons alors montré que la tyrosinase peut être impliquée dans des réactions de réticulation des protéines. Sachant l'iplication de la tyrosinase dans la formatotion de la mélanine, nous avons entamé la recherche d'inhibiteurs de cette enzyme en vue

de les utiliser comme moyens de lutte contre la pigmentation que ce soit chez en cosmétique ou en agroalimentaire (brunissement des aliments).

Les effets inhibiteurs sur l'activité monophenolase de la tyrosinase contenue dans la phase incolore de l'encre de seiche *Sepia officinalis* de dérivés des aryl-butènes ont été examinés. Les résultats montrent que la substitution du radical hydroxyle par d'autres fonctions fait perdre l'effet des composés inhibiteurs. En outre, le composé 8 (Ferrociphenol) a été trouvé être le plus puissant inhibiteur de l'activité de la tyrosinase parmi ces composés ayant une valeur IC50 de 0,02 mM. Les analyses cinétiques ont montré que trois composés avaient un type d'inhibition compétitif alors celui d'un autre composé était non compétitif. L'effet de certains composés a été aussi exemplifié par leur inhibition de la réticulation de la caséine. Fait intéressant, l'effet réticulant des composés «compétitifs» persistait après 18 h d'incubation, tandis que celui du composé à inhibition "non-compétitive" a été perdu après 4 heures.

Partie I: Génétique du cancer

Le cancer colorectal (CRC) peut avoir une composante familiale ou être de forme sporadique. Le CRC héréditaire représente environ 20-25% de tous les cancers colorectaux et la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) ne représente que 1% de ces cancers. Elle est présente sous deux formes :

-Une forme à transmission autosomique dominante caractérisée par l'apparition des centaines voire des milliers de polypes adénomateux colorectaux vers l'âge de la puberté. Le gène impliqué dans la PAF classique est le suppresseur tumoral APC (Adenomatous Polyposis Coli).

- Une forme à transmission autosomique récessive caractérisée par l'apparition à l'âge adulte d'une centaine de polypes adénomateux. Cette forme est associée à des mutations bialléliques du gène hMYH qui est un gène de réparation par excision de base des dommages oxydants de l'ADN.

La voie Wnt/ ß-caténine dans les tumeurs colorectales : Etude de différents partenaires APC, ß-caténine, RIP140 et L-cor.

Il est clairement démontré que la voie de signalisation Wnt/ ß-caténine est dérégulée dans la cancérogenèse colorectale. Cette dérégulation peut toucher les différents membres de cette voie dont le suppresseur tumoral APC qui peut être inactivé par perte allélique, méthylation aberrante ou mutations dans les CCR. La ß-caténine est également un acteur clé dans cette voie de signalisation puisque cette protéine est douée d'une dualité fonctionnelle en ce sens

Dans notre étude, nous avons analysé l'expression de la ß-caténine et de l'APC par immunohistochimie dans 124 tumeurs primaires et les ganglions lymphatiques correspondants de 41 cas. Nous avons considérée l'expression aberrante de la ß-caténine si elle se trouve dans le noyau et/ou cytoplasme alors que la localisation membranaire de cette protéine est considérée normale assurant la jonction cellulaire et une architecture tissulaire correcte. La protéine APC est à localisation cytoplasmique exclusivement. Les corrélations entre l'expression de l'APC et la distribution cellulaire de la ß-caténine avec les caractéristiques clinicopathologiques majeures et la survie globale ont été examinées. De plus, les mutations au niveau de la région MCR du gène APC, où plus de 60% de mutations somatiques se produisent, et de l'exon 3 du gène CTNNB1 ont été recherchées dans 25 ADN extrait de tumeurs coliques afin de mieux caractériser ces deux membres de la voie de signalisation Wnt dans la cancérogenèse colorectale.

La ß-caténine à localisation nucléaire et/ou cytoplasmique a été détectée dans 48,4 % des

tumeurs et 43,9 % des ganglions lymphatiques. Cette localisation a été significativement corrélée à la taille tumorale et l'invasion vasculaire dans les tumeurs (respectivement p=0.004 et p=0.05) et à la différenciation tumorale et la métastase dans les ganglions lymphatiques (respectivement p=0.04 et p=0.03).

Par ailleurs, nos résultats ont montré que la perte d'expression membranaire de la ß-caténine a été détectée dans 58,1 % des tumeurs et qu'elle est significativement associée à la métastase et l'invasion vasculaire (respectivement p=0.025 et p=0.028), suggérant que le manque de ß-caténine membranaire est relié au potentiel de métastase et à l'envahissement vasculaire. La perte de la ß-caténine membranaire est plus fréquente dans les ganglions lymphatiques (85,4 %) que dans les tumeurs (58.1 %) avec une tendance d'association positive (p=0.109). De plus, nous avons montré qu'une expression anormale de la ß-caténine (à localisation nucléaire et cytoplasmique) était corrélée avec une durée courte de la survie globale.

L'expression cytoplasmique de l'APC a été trouvée dans 22 % des tumeurs primaires et 14 % des ganglions lymphatiques. Une association significative positive a été observée entre la localisation nucléaire/cytoplasmique de la ß-caténine et cytoplasmique de l'APC, dans les tumeurs primaires et les ganglions lymphatiques (p=0.000 et p=0.008 respectivement).

D'autre part, la recherche de mutation au niveau de l'exon 3 du gène CTNNB1 a montré que 4 des 25 tissus sont porteurs de mutations. Ces mutations sont des substitutions d'une seule base touchant les résidus Sérine siège de phosphorylation de la □-caténine par la GSK-3β (codons 29 à 48). Deux patients portent la mutation c.97T>C (p.S33P), un la mutation c.98 C>T (p.S33F), et un la mutation c.141 T>G (p.S47R). Les quatre tumeurs hébergeant ces mutations ont montré une accumulation anormale de la □-caténine dans le noyau/cytoplasme.

La région MCR (Mutation Cluster Region) du gène APC, située au niveau de l'exon 15, s'étalant entre les nucléotides 1286 et 1513 où plus de 60% des mutations somatiques se produisent, a été étudiée par séquençage direct de l'ADN génomique extrait de 25 tumeurs primaires. Parmi les 25 cas, les mutations de l'APC ont été identifiées dans 13 cas, et toutes sont de type non sens ou causent un décalage de cadre de lecture, résultant en une protéine APC tronquée. Dans la présente étude, 52% des cas étudiés portent des mutations au niveau de la région MCR résultant en une protéine APC tronquées. Six des 13 mutations identifiées, (p.K1308RfsX5, p.Q1328HfsX2, p.S1371KfsX2, p.I1418NfsX3, p.S1421RfsX1, et p.C1502LfsX11), n'ont pas déjà été rapportées dans les bases de données HGMD et LOVD. Nous avons identifié la mutation p.Q1406X chez deux patients et la mutation récurrente dans les bases de données p.R1450X chez un patient. En outre, il est important de noter que les mutations au niveau de l'APC et de CTNNB1 ne sont pas retrouvées ensemble, ce qui suggère que celles-ci peuvent indépendamment amorcer le processus de cancérogenèse.

Des études récentes ont montré l'implication du facteur RIP140 dans la cancérogenèse colorectale via la voie de signalisation Wnt/b-caténine. En effet, RIP140 exerce cet effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire à travers l'activation transcriptionnelle du gène APC d'une part et l'inhibition de la β-caténine et donc de l'expression de ces gènes cibles d'autre part. Le taux d'expression de RIP140 est faible dans les cellules tumorales par rapport à la muqueuse colique saine tant au niveau mRNA que protéine, et corrèle avec un mauvais pronostic.

En collaboration avec le Dr Vincent Cavailles de l'Institut de recherche en Cancérologie de Montpellier, nous envisageons de :

- Décrypter certains des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression de ce gène dans les cancers colorectaux et gastriques.
- Préciser les interrelations entre RIP140 et les voies de signalisation Wnt et p53 dans les cellules épithéliales digestives.
- Etudier l'expression des gènes RIP140 et L Cor dans les cancers colorectaux sporadiques. par immunohistochimie et le statut de méthylation du promoteur RIP par MS PCR.
- Analyser l'effet de RIP140 sur les voies Wnt et p53 dans les cellules de cancers digestifs.
- Utiliser le modèle levure pour étudier l'effet de RIP140 sur la voie p53.

Ce travail a débuté pendant l'année 2014-2015 et s'inscrit dans le cadre de la thèse en cotutelle de Melle Mouna Triki

Etude du statut de méthylation et de l'expression d'UCHL1 et du statut mutationnel de P53 dans les adénocarcinomes coliques sporadiques.

Il est clairement établi que tout processus de carcinogenèse implique un gain d'activité pour les oncogènes et une perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur. L'un des GST clé dont l'expression est souvent altérée dans les tumeurs est sans doute TP53. En effet, ce gène est muté dans 50 % des cancers humains avec des fréquences variables selon le type de néoplasie. Ce facteur de transcription module l'expression de différents gènes impliqués dans dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des erreurs dans l'ADN et l'initiation de l'apoptose. Vu son rôle important, le taux cellulaire de P53 est strictement contrôlé notamment par un mécanisme de « feed-back » négatif par le biais de la protéine MDM2. Cette régulation conduit à la dégradation de la P53 via le protéasome faisant intervenir les désubiquitinases dont UCHL1.

Nous nous sommes posé la question suivante: est ce que l'expression d'UCHL1 pourrait affecter celle de P53 dans les tumeurs colorectales primaires de patients tunisiens ? A cet effet, nous avons analysé le statut de méthylation du promoteur UCHL1 et le statut mutationnel du gène P53 dans 35 tumeurs colorectales. Nos résultats ont montré que 68,57 % des tumeurs ont un profil méthylé (UM/M) et que l'expression négative d'UCHL1 a été observée dans 93,8 % avec une tendance de corrélation (p=0.06). Par ailleurs, la recherche de mutations dans les exons 5-6 et 7-8 du gène P53 correspondants au domaine de liaison à l'ADN, a été réalisée sur 23 échantillons tumoraux. Différentes mutations pour la plupart des substitutions ont été identifiées dans ce domaine fonctionnel de P53.

Détermination du Phénotype Méthylateur dans les biopsies colorectales

Pour déterminer le phénotype Méthylateur des ilots CpG (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype) de 61 biopsies tumorales, nous avons fait appel à la MS PCR Le panel de gènes utilisé est constitué de 5 gènes décrits dans littérature et qui selon leur statut méthylé ou non méthylé permettra de déterminer le profil CIMP de chaque biopsie. Un échantillon est CIMP+ si au moins 3 gènes sur 5 sont méthylés, inversement il est CIMP- si moins de 3 gènes sont méthylés. La connaissance du profil CIMP est déterminante pour le choix du protocole thérapeutique et de la réponse au traitement. Les pourcentages de méthylation obtenus sont récapitulés dans le tableau

Promoteur	Nbre d'échantillons méthylés	% de méthylation
CACNA1G	47	77%
IGF2	29	47%
NEUROG1	39	63%
RUNX3	20	52%
SOCS1	16	51%

Le programme SPSS a été utilisé pour mettre en évidence des associations entre le phénotype CIMP et les paramètres clinico-pathologiques des patients. La seule corrélation significative a été observée entre le phénotype CIMP et l'âge au moment du diagnostic. En effet, 100% des patients âgés de moins de 60 ans sont de phénotype CIMP+ (p=0,008).

Analyse comparative de l'expression de NOS2 dans différents cancers d'origines épithéliales chez des patients Tunisiens

L'oxyde nitrique synthase (NOS) est une oxydoréductase dont le taux d'expression peut être affecté dans différentes pathologies humaines dont les cancers. Nous avons évalué par Q PCR le taux de NOS2 (forme inductible) dans des les cancers suivant : Sein, Colorectal, Nasopharynx et Mélanome. Des taux d'expression significativement variable d'un cancer à l'autre a été observé. De plus la surexpression de NOS2 serait un facteur de mauvais prognostic.

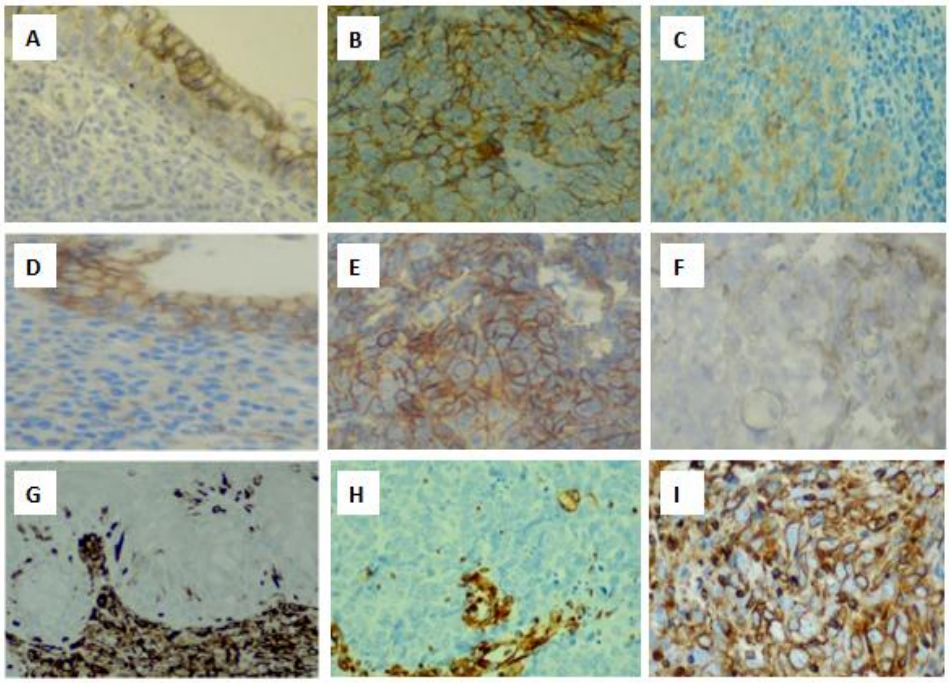
Analyse des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer du nasopharynx (NPC)

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un phénomène de trans-différenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses qui a été initialement défini au cours de l'embryogenèse et récemment décrit dans la pathologie des cancers. Il s'agit d'un changement morphologique qui se traduit au niveau moléculaire par la disparition des marqueurs épithéliaux (cytokératine, E-cadhérine…) au profit des marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine…), conférant aux cellules tumorales la capacité de migrer et d'envahir d'autres organes et de résister aux traitements conventionnels.

Afin de définir cette transition dans les tumeurs NPC, nous avions étudié l'expression des protéines E-cadhérine, β-caténine et Vimentine par IHC. Le contrôle interne de chaque réaction a été établi sur les tissus normaux de voisinage de la tumeur montrant un marquage membranaire intense et uniforme de l'E-cadhérine et la β-caténine au niveau des structures épithéliales et un marquage cytoplasmique de la vimentine dans les cellules stromales, y compris les fibroblastes et lymphocytes (**Figure 1**). Dans les cellules tumorales, nous avons montré une véritable diminution de l'expression de l'E-cadhérine et de la β-caténine dans 30 (46 %) et 35 cas (54%), respectivement. Ces deux marqueurs d'adhésion ont été significativement corrélés ($r = 0.637$, $p = 0.001$) et l'intégrité membranaire de ce complexe n'a été détecté que dans 27/65 cas (41.5 %). Par ailleurs, le marqueur mésenchymal, vimentine, était observé dans 21/65 (32.3 %) des cas. Il a été inversement corrélé avec l'expression membranaire de l'E-cadhérine et de la β-caténine ($r = - 0.462$; $p = 0.001$ et $r = - 0.548$; $p = 0.001$, respectivement). De même, notre étude de corrélation avec les paramètres

cliniques a permis de montrer que la perte d'intégrité membranaire du complexe E-cadhérine / β-caténine est significativement plus importante chez les malades ayant une métastase à distance (M1 vs M0) (p = 0.007).

En utilisant la méthode de Kaplan-Meier, nous avons également montré une corrélation significative entre la perte d'intégrité membranaire du complexe E-cadhérine / β-caténine et une survie plus courte (survie globale p = 0.008 et survie sans maladie p = 0.02) (**Figure 2**). Ces associations sont également maintenues par l'analyse multi-variée, ce qui nous a permis de suggérer le statut du complexe E-cadhérine / β-caténine comme un facteur pronostique indépendant. Finalement, nous proposons un nouvel élément pronostique en relation avec l'EMT qui pourrait envisager d'autres critères de classification et également d'autres modalités de traitement des malades atteints de NPC.



Epithélium de surface foyer tumoral 1 foyer tumoral 2

Figure 1 : Observations microscopiques de l'immuno-marquage de l'E-cadhérine (A, B, C), β-caténine (D, E, F) et Vimentine (G, H, I).

Epithélium de surface : marquage positif de l'E-cadhérine et la β-caténine (A, D): et négatif de la vimentine (G)

Foyer tumoral 1 : marquage intense de l'E-cadhérine et la β-caténine (B, E): et négatif de la vimentine (H)

Foyer tumoral 2 : marquage faible de l'E-cadhérine et la β-caténine (C, F): et intense de la vimentine (I)

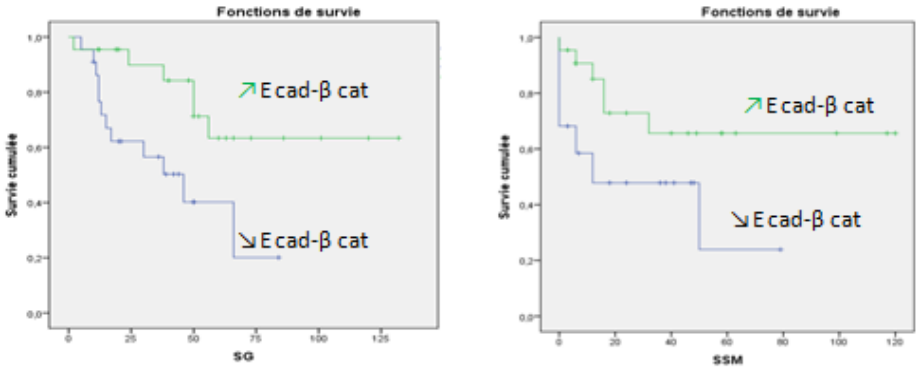


Figure 2 : Représentation de la survie globale (SG) et survie sans maladie (SSM) en fonction de l'intégrité du complexe E-cadhérine / β-caténine

Etude génétique et moléculaire du syndrome de Bernard Soulier :

Le Syndrome de Bernard Soulier (BSS) est une pathologie hémorragique héréditaire rare qui se transmet selon le mode autosomique récessif. Les patients atteints par ce syndrome présentent des plaquettes morphologiquement géantes et incapables d'agréger en présence de la ristocétine. De plus, ils présentent un temps de saignement prolongé et un taux plaquettaire faible.

De point de vue moléculaire, le BSS est dû à un défaut quantitatif et/ou qualitatif du complexe GPIb-IX-V exprimé à la surface plaquettaire. Ce complexe est indispensable pour assurer l'étape d'adhésion des plaquettes au sous endothélium endommagé.

Il existe trois gènes candidats pour le BSS : GPIbβ, GPIbα et GPIX. Ils sont à implication équiprobable.

Malgré la rareté de ce syndrome, il a été l'intérêt de plusieurs études européennes, japonaises et nord-américaines. Cependant les populations arabes et africaines n'étaient pas étudiées. Pour cette raison, la base moléculaire de cette maladie a été étudiée pour la première fois en Tunisie, par notre équipe. Une mutation non sens (Ser23Stop) a été identifiée dans le gène GPIbβ. Cette mutation semble être spécifique à la population tunisienne, d'ailleurs nous avons suggéré l'idée de mutation fondatrice.

La présente étude s'inscrit dans la continuité de ces travaux durant laquelle nous avons étudié une nouvelle famille tunisienne atteinte par le BSS. Nous avons commencé par la vérification de la mutation fondatrice en amplifiant et séquençant la région couvrant ce changement. Nous avons montré l'absence de la Ser23Stop chez le patient et sa mère. Il ne s'agit pas donc de la mutation fondatrice.

Par la suite, et dans le but d'identifier la mutation responsable du BSS chez cette famille, nous nous sommes intéressés à étudier la totalité des ORF des trois gènes candidats. Les résultats obtenus montrent l'absence de mutation dans le gène GPIbβ et GPIX du patient et ses parents. Quant au gène GPIbα, nous avons séquencé une bonne partie de son ORF. Cependant, aucune mutation n'a été observée. L'achèvement de séquençage de ce gène est en cours de réalisation.

Partie II Expression hétérologue de protéines d'intérêt

L'oncoprotéine de l'EBV :

Le pouvoir oncogène du virus de l'Epstein Barr (EBV) a été démontré grâce à son association avec plusieurs tumeurs humaines, y compris le lymphome de Burkitt, le cancer du nasopharynx (CNP), le lymphome de Hodgkin, le syndrome lymphoprolifératifpost-transplantationnel, certains lymphomes liés aux cellules T/NK, et une proportion de carcinomes gastriques.

La protéine membranaire de latence 1 (LMP1) est l'une des principales protéines virales codées par l'EBV, elle est indispensable pour l'immortalisation des cellules B in vitro. La LMP1 peut induire des effets sévères dans les cellules épithéliales, ce qui peut expliquer ses propriétés oncogéniques. Lorsqu'elle est exprimée dans les cellules épithéliales tumorales, la LMP1 potentialise la croissance indépendamment de l'ancrage cellulaire et améliore considérablement la motilité et l'invasion cellulaire. La LMP1 est une protéine transmembranaire de 63 kDa comprenant une courte partie N-terminale cytoplasmique, six régions transmembranaires hydrophobes en hélices alpha et une longue queue C-terminale cytoplasmique impliquée dans signalisation via les régions CTAR1, CTAR2 et CTAR3. Ces domaines contiennent des sites d'interaction avec les protéines adaptatrices de signalisation, à savoir les facteurs associés au TNF (TNFR-TRAFS), le domaine de mort TNFR-associé au TNF (TRADD), la protéine kinase (RIP) et la Janus kinase (JAK) en impliquant ainsi les voies de transduction : NF-kB, JNK/p38-SAPK, PI3-K/Akt, ERK-MAPK et JAK / STAT.

Plusieurs approches ont été entreprises pour moduler ou supprimer l'activité de l'oncoprotéine LMP1 dans les cellules tumorales, certains parmis eux ont eu recours aux oligoantisens, mi-RNA, aptamères, DNAzymes, ribozymes,...

Dans notre laboratoire, Nous avons opté pour la recherche de peptides synthétiques interagissant avec la LMP1 par la technique du Phage Display afin d'identifier ceux qui sont capables de l'atténuer, voire d'inhiber son activité tumorale.

Nous avons effectué la synthèse des trois boucles extracellulaires de la protéine ainsi que six domaines cytoplasmiques important dans la signalisation cellulaire. Par la suite, nous avons sélectionné des peptides antagonistes à chacun de ces domaines par la technique du Phage Display. Environ 200 clones phagiques ont été sélectionnés et séquencés et une dizaine de peptides ont été synthétisés et ont fait l'objet d'études d'interaction peptide cible/ peptide antagoniste par différentes techniques d'étude d'interaction protéine/protéine à savoir ELISA, ITC et RMN.

Compte tenu des différents résultats obtenus, nous avons retenu 1 peptide (B1.12) qui a donné une interaction importante avec la première boucle extracellulaire LMP1.

Nous avons alors re-synthétiser ce peptide sous forme couplée à la Biotine et la fluorescéine afin de le tester et le suivre dans des modèles de cultures cellulaires qui expriment ou pas

l'oncoprotéine virale. Ces travaux sont en cours afin d'évaluer la fonctionnalité du peptide B1-12 vis-à-vis de LMP1.

Recherche de peptides antagonistes du VEGF

La croissance d'une tumeur solide est limitée par sa vascularisation. Si elle n'était pas envahie par les capillaires, elle ne disposerait pour sa croissance que des éléments nutritifs diffusés par l'environnement proche, elle ne pourrait donc pas grossir au-delà d'un diamètre de quelques millimètres. Le taux de croissance de la tumeur augmente fortement dès qu'elle est vascularisée. Certains facteurs de croissance ont été identifiés comme étant indispensables pour provoquer l'angiogenèse tumorale. Le « Vascular Endothélial Growth Factor » (VEGF) est la protéine grâce à laquelle les tumeurs acquièrent leur vascularisation c'est une molécule clé de l'angiogenèse. Plusieurs variants sont codés par le gène VEGF suite à un splicing alternatif. Le VEGF 165 est un puissant stimulateur de la croissance d'un grand nombre de tumeurs. Cela en fait une cible de choix pour le traitement d'un grand nombre de tumeurs solides. Le clonage du VEGF a permit le développement de molécules inhibitrices des différentes voies de signalisations.

Notre projet concerne le développement de courtes séquences peptidiques pour le traitement du cancer et en particulier le ciblage du VEGF. Ces séquences peptidiques devraient reconnaitre le VEGF pour limiter sa biodisponibilité et inhiber de ce fait la néo-vascularisation et l'angiogenèse ou pour diminuer/supprimer sa capacité de liaison à son récepteur. Notre travail a commencé par une amplification par RT-PCR du VEGF à partir de cDNA disponibles au laboratoire. Trois bandes de tailles différentes ont été révélées sur un gel d'agarose 1%, dont l'une d'entre elles, après séquençage, a montré qu'il s'agissait bien du VEGF forme 165. Les produits PCR ont été, par la suite, insérés au vecteur pGEMT easy. Les plasmides recombinants ont été analysés par une simple digestion avec l'enzyme *EcoRI* et par PCR en utilisant les amorces spécifiques du gène VEGF. Les clones positifs obtenus ont été vérifiés par séquençage.

La production de la protéine recombinante a été effectuée dans le système d'expression *Ecoli* BL21(DE3) en utilisant le vecteur pET21a. Les cultures bactériennes ainsi que la production du VEGF 165 sont effectuées dans du milieu 2YT+Amp 100 µg/ml. La production est induite par 0.4 mM d'isopropylthio-β-galactoside (IPTG) lorsque la DO_{600} = 0.7 et elle est effectuée à 37°C. Après 20 h la culture est centrifugée pour séparer le milieu de culture et les bactéries. La lyse des cellules par le lysozyme puis par des ultrasons a donné le meilleur rendement. Le lysat bactérien a été purifié par chromatographie d'affinité en utilisant la colonne HisTrap 1ml. Les fractions obtenues après élution par un gradient d'imidazole ont été analysées par SDS PAGE puis par Western Blot.

Des expériences de phage display ont été faites pour la sélection de peptides interagissant avec la protéine pro-angiogénique VEGF 165. La banque de peptides sur phage utilisé est Ph.D.C7C, il s'agit d'une banque contrainte de sept acides aminés reliés par un court espaceur (trois résidus Glycines et un résidu sérine) à la protéine PIII du manteau du bactériophage filamenteux M13. La souche bactérienne utilisée pour la propagation du phage est le souche d'*Ecoli* ER2738 qui porte l'épisome F+ nécessaire à l'infection par le phage M13.

Trois tours de panning ont été faits en utilisant 10 µg de la protéine recombinante VEGF 165.

Faute de quantité suffisante en protéine VEGF pure, nous n'avons analysé par ELISA qu'une dizaine de phages, deux ont répondu correctement et deux plus faiblement. L'ADN simple brin des clones a été vérifié sur gel d'agarose 0.7%. Le séquençage des clones obtenues par l'amorce 96 gIII est en cours.

Purification de la glycocalicine humaine

Le complexe GPIb-IX-V est un récepteur constitutif exprimé à la surface des plaquettes. Il s'agit d'une composante fonctionnellement très importante puisqu'elle intervient dans l'étape d'adhésion plaquettaire au sous-endothélium endommagé. Ce complexe est formé par quatre glycoprotéines nommées GPIbα, GPIbβ, GPIX et GPV. La protéine GPIbα contient, à son extrémité N-terminale, le site de fixation pour le facteur de Von Willebrand FVW et la thrombine indispensable pour le déroulement du mécanisme d'hémostase. Le clivage de GPIbα par diverse protéinases au cours de la destruction des plaquettes génère un fragment hydrophile comportant l'ensemble du domaine extracellulaire de GPIbα nommé la glycocalicine. Chez l'individu sain, la concentration de cette protéine varie entre 1 et 3 µg/ml. Cependant, ces valeurs peuvent varier dans certains cas pathologiques en relation avec le dysfonctionnement ou la destruction plaquettaire, d'où viens l'intérêt du dosage sérique de cette protéine.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à purifier la glycocalicine à partir du plasma riche en plaquettes issu d'un prélèvement sanguin humain frais. Nous avons procédé en deux étapes : une chromatographie HPLC préparative suivie d'une chromatographie d'affinité sur colonne NHS ayant fixé un anticorps reconnaissant spécifiquement la glycocalicine.

Dans le but de valoriser les poches plaquettaires périmées, nous avons essayé de purifier la glycocalicine à partir d'une poche périmée. Nous avons procédé par la même méthode de purification ; néanmoins, nous avons trouvé un fragment de taille inférieure à l'attendu correspondant à un produit de protéolyse. Nous avons donc conclu que la glycocalicine ne peut être purifiée qu'à partir d'un prélèvement frais.

Recherche des molécules d'origine végétale inhibant l'apoptose médiée par la P53 sauvage chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

L'apoptose est une mort cellulaire définie par certaines caractéristiques typique ; condensation cellulaire, condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN… ce phénomène présente un rôle essentiel dans physiologie normale d'un organisme, et toute anomalie d'apoptose peut être responsable du déclenchement de nombreuse pathologies caractérisées par un défaut (cancer, infection virale…) ou par un excès (maladies dégénératives). Parmi les régulateurs de l'apoptose on cite la protéine p53, elle est souvent décrite comme gardienne du génome elle intervient pour maintenir son intégrité lors des perturbations cellulaires. L'activation du p53 conduit à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, réparation de l'ADN endommagé ou apoptose par différents mécanismes qui varient essentiellement avec sa localisation,

Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont montré que la p53 humaine affecte la croissance de la levure sur milieu riche à 30°c, et sur milieu minimum. Par la suite, le même groupe a montré que l'expression de la protéine p53 humaine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu minimum induit une mort cellulaire dont les caractéristiques sont typiques de l'apoptose ; externalisation des phosphatidylsérines membranaires, dégradation de l'ADN et production des ROS (reactive oxygen species).

Nous avons donc projeté d'exploiter ce système pour la recherche des molécules d'origine végétale douées d'une action anti-apoptotique. Dans un premier temps, nous avons essayé plusieurs types d'extraits de deux végétaux ; un fruit de la famille des rosacées qui est le coing *Cydonia vulgaris*, et des graines d'une plante herbacées appartenant à la famille des renonculacées *Nigella sativa* connue communément sous le nom de nigelle.

Phénotypiquement l'effet anti-apoptotique était net et bien prononcé, les levures ne reprennent leur croissance qu'en présence des extraits et nous avons montré, par une étude génétique du niveau d'expression de la protéine p53 en présence des extraits par RT-PCR, Northern et Westhern blot que cette ou ces molécule(s) du coing ou des nigelles, ayant le pouvoir anti-apoptotique pouvaient agir soit sur l'expression du gène p53, soit sur l'effet engendré par l'expression de la protéine p53 et n'affecte donc pas son expression. Ces résultats on fait l'objet d'un article en cours de soumission.

Dans le cadre d'un stage dans l'UIT de CAEN-France nous avons utilisé la technique infrarouge transformé de fourrier qui est une technique permettant d'avoir des information sur la composition chimique d'un échantillon, pour l'étude des différences entre cellule de levure en apoptose en comparaison avec le contrôle ainsi qu'avec des cellules traitées avec l'extrait des nigelles.

Nous avons purifié la molécule anti-apoptotique et nous avons testé son effet sur des cellules animales P53+/P53- lors d'un stage à l'UFR de médecine à Versailles-France. Selon les conditions et protocoles adoptés ainsi qu'aux doses utilisées, nous n'avions pas décelé d'effet de la molécule de Nigelle sur les lignées cellulaires p53+ ou p53-.

Actuellement nous purifions de nouveau de grandes quantités de la molécule anti apoptotique pour en faire l'identification par des analyses chimiques en collaboration avec d'autres collègues Français..

Recherche de gènes de levure suppresseurs de l'apoptose médiée par la P53 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Dans le même cadre d'étude, nous avions montré que la surexpression de la thioredoxine chez la levure réduisait considérablement l'effet apoptotique de la p53 chez la levure. Nous avons montré que ceci passerait par la capacité de trx2 à réduire l'effet toxique des ROS engendrés par cette overexpression.

Nous avons alors pensé étendre notre démarche vers la recherche d'autres gènes qui, quand ils seront surexprimés, seraient capables de supprimer l'effet pro-apoptotique de p53 chez la levure.

La démarche est simple : transformer une levure exprimant p53 par une banque génomique sauvage de levure construite sur vecteur multicopie. Les deux vecteurs p53 et de la banque portent chacun un marqueur d'auxotrophie différent.

Nous avons testé deux banques génomiques et nous en avions isolés des centaines de clones positifs. L'isolement des plasmides recombinants et la re-transformation de la levure a confirmé le résultat pour la plupart des clones.

La plupart des clones hébergeaient des inserts de grande taille. Certains clones ont été déjà séquencés à leurs extrémités, ce qui nous a permis de connaitre la région du génome de la levure qu'ils couvraient. Le premier clone qui a été analysé plus en détail porte cinq gènes dont deux tronqués à ses extrémités et qui avaient donc été éliminés d'office. Restaient trois gènes : un qui ne semble pas un bon candidat tellement sa taille est petite et sa fonction est méconnue. Les deux candidats potentiels restant sont :

-le gène MRS3 : le meilleur candidat : il s'agit d'un transporteur de la membrane interne mitochondrial impliqué dans le transfert du fer. Sachant qu'il a été démontré, dans les cellules animales, que la déplétion en fer entraine l'accumulation de ROS mitochondriaux et par la suite de l'aopotose, nous pensons que MRS3 serait le meilleur candidat dans notre situation.

-Le second est un gène dont la fonction reste encore méconnue malgré sa taille.

Nous sommes en train de réaliser le clonage de chaque gène seul afin de savoir qui est le vrai responsable du phénotype observé.

Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux

(LBPE)

مخبـر الأساليـب البيـولوجيّـة البيئيّة

Responsable : Pr. Sami SAYADI

Les recherches conduites au LBPE se déclinent en deux axes transversaux renforçant la compréhension des mécanismes et la maîtrise des bioprocédés. Le premier axe ou programme concerne la transformation de la biomasse pour dépolluer et/ou produire de l'énergie en utilisant des communautés microbiennes complexes ou pures. Le second axe concerne la réhabilitation de sites pollués par bioremédiation.

Liste des membres du laboratoire de recherche :

Nom et Prénom	***Qualité***
Sami Sayadi	Professeur
Abdelhafidh Dhouib	Professeur
Hatem Ben Ouada	Professeur
Mohamed Chamkha	Maître de conférences
Sonia Khoufi	M.A.
Mariem Ellouze	M.A.
Fatma Karray	M.A
Hatem Zaghden	M.A
Zouhaier Bouallegui	M.A
Ines Feki	M.A. (ISB-Sfax)
Héla Ghorbel	M.A. (ISB-Sfax)
Ali Mekki	M.A. (FS-Gafsa)
Nozha Abid	M.A. (FS-Sfax)
Meriem Jemli	M.A (FS-Bizerte)
Sonia Ben Younes	M.A. (FS-Gafsa)
Hanen Chakroun	M.A (ISB-Sidi Thabet)
Hédia Jemai	As. (FS-Gafsa)
Thabet Yangui	As. (ISBS-Sfax)

Fathi Aloui	Ingénieur en chef
Firas Feki	Ingénieur en chef
Mohamed Ali Masmoudi	Ingénieur principal
Manel Hamza	Technologue
Haifa Chtourou	Technologue (ISET-Sfax)
Jihen Ammar	Technologue (INSTM-Monastir)
Najla Mhiri	Technicien Principal
Slim Louki	Technicien
Nidhal Baccar	Technicien
Sonia Kchaou	Préparateur
Najwa Mlaik	En post doc (CBS)
Safa Souilem	En post doc (CBS)
Fatma Zili	En Thèse
Nehla Mezhoud	En Thèse
Manel Ben Abdallah	En Thèse
Fatma HELAOUI	En Thèse
Fatma Hadrich	En Thèse
Hanen Chaari Kharrat	En Thèse
Ines Dahmen	En Thèse
Raida Bradai Karray	En Thèse
Alif Chebbi	En Thèse
Amina Maalej	En Thèse
Asma Mahmoudi	En Thèse

Emna Feki	En Thèse
Ahlem Jebali	En Thèse
Maha Affes	En Thèse
Asma Saadallah	En Thèse
Dorra Hentati	En Thèse
Mariem Jeddi	En Thèse
Mokhles Kouas	En Thèse
Mouna Kehili	En Thèse
Sabrine Ben Ouada	En Thèse
Meriam Cheffi	En Mastère
Raouia Boujelben	En Mastère

L'expertise en biotechnologie de l'environnement du laboratoire LBPE pendant les dernières années peut être résumée dans le développement des procédés aérobies et anaérobies, les procédés MBR et l'isolement et la caractérisation phylogénique de nouvelles souches à partir de biotopes contaminés. Ceci nous a permis de définir des "états de l'art" et d'appliquer ces technologies pour la valorisation de plusieurs résidus et déchets liquides et solides au moyen de fermentations microbiennes. C'est dans ce contexte que nous présentons dans ce rapport quelques exemples de bioprocédés développés pour le traitement et la valorisation d'effluents prioritaires en Tunisie.

Les travaux réalisés durant l'année 2014 ont porté sur le développement des procédés pour le traitement et la valorisation des rejets et des bio-ressources (Programme 1). Le second thème concerne la réhabilitation des sites pollués par bioremédiation (Programme 2).

1. Développement des procédés pour le traitement et la valorisation des rejets et des bio-ressources :

1.1. Étude du traitement d'un effluent textile par un bioréacteur à membranes immergées :

1.1.1. Cadre du travail :

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Projet Européen BioNexGen «Development of the next generation membrane bioreactor system (FP7-NMP-2009-SMALL-3)» qui a pour objectif de développer une nouvelle classe de membranes fonctionnelles pour les bioréacteurs membranaires (BRM) par incorporation de nanomatériaux dans le but de réduire le colmatage membranaire et améliorer la qualité de l'eau traitée.

1.1.2. Montage expérimental : (Fig. 1 et 2) :

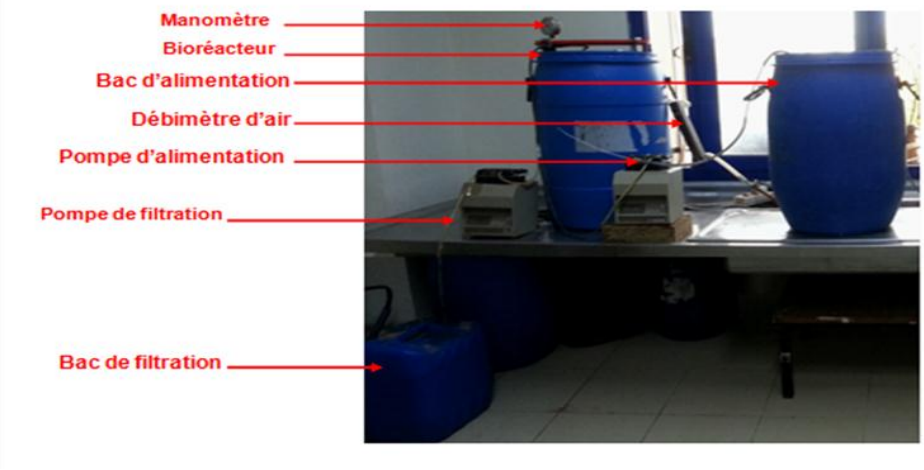


Fig. 1: Bioréacteur à membranes immergées mis en place.

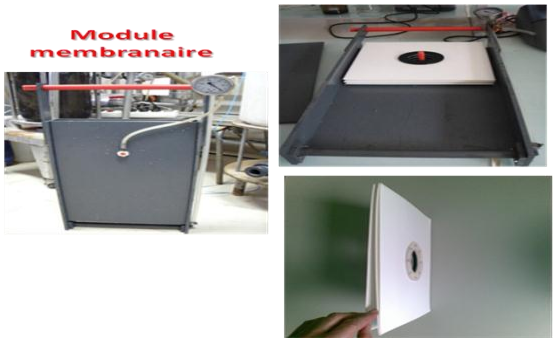


Fig. 2: Module membranaire utilisé.

1.1.3. Caractéristiques physico-chimiques des effluents textiles utilisés :

Durant le fonctionnement du BRM, les caractéristiques des eaux usées textiles brutes étaient très variables en raison des variations dans le programme de production textile et de l'utilisation de divers produits chimiques et de colorants. Dans le **tableau 1**, sont résumées les principales caractéristiques des échantillons d'effluents textiles bruts.

Tableau 1: Caractéristiques des effluents textiles bruts utilisés.

Paramètres	E1	E2	E 3	E 4	E 5	E 6
pH	10.95	12.48	12.60	12.34	11.78	11.26
CE (mS/cm)	5.12	8.32	13.22	11.76	6.41	8.26
DCO (mg/l)	3089	1916	1838	1463	2220	1871
DBO_5 (mg/l)	300	900	600	900	1375	1250
DBO_5/DCO	0.1	0.47	0.33	0.62	0.62	0.67
COT (mg/l)	898	686	563	614	439	629
CIT (mg/l)	168.3	127.4	75.3	-	-	-
MES (g/l)	0.46	1.07	0.22	1.21	0.67	0.21
MVS (g/l)	0.26	0.61	0.12	0.71	0.01	0.11
N total	103.6	74.9	119.6	74.2	118.3	116.2
Ions (mg/l)						
Calcium (Ca)	6.94	1.34	9.33	10.88	11.9	7.64
Potassium (K)	1.13	8.13	68.84	90.84	110.8	17.13
Sodium (Na)	100.4	162.4	142.4	226.0	118.0	142.4
Magnesium (Mg)	10.39	40.39	40.13	34.13	40.13	8.39
Métaux lourds (mg/l)						
Cuivre (Cu)	0.003	0.001	–	0.011	–	–
Zinc (Zn)	0.092	0.018	0.106	0.104	0.179	0.012
Nickel (Ni)	–	–	0.027	–	–	–
Chrome (Cr)	–	–	–	–	–	–
Cadmium (Cd)	0.008	0.008	–	–	–	–

Les différents effluents utilisés pour alimenter le BRM ont montré des valeurs élevées de pH (11-12) et de salinité (3-5 g/l). De telles conditions, ne sont pas favorables pour l'activité biologique. Par conséquent, l'effluent a été dilué et le pH a été ajusté à 8 afin d'assurer une activité biologique maximale. Le rapport DBO_5/DCO des effluents bruts était variable ce qui suggère une biodégradabilité variable en fonction de l'échantillon prélevé.

1.1.4. Performance d'élimination de la DCO par le BRM :

Le BRM a permis une réduction de la DCO de l'effluent textile d'alimentation allant de 52 jusqu'à 100%. Si les rendements d'abattement de la DCO ne sont considérés que vers la fin de chaque phase, les taux d'élimination de la DCO variaient entre 93 et 98% (**Fig. 3**).

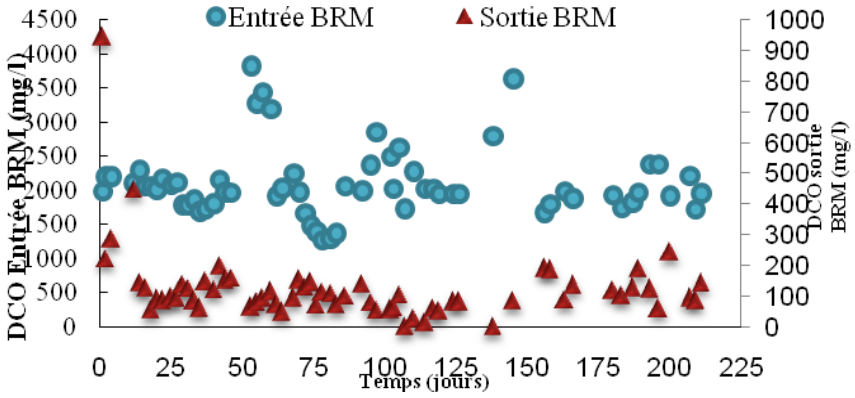


Fig. 3: Evolution de la DCO à l'entrée et à la sortie du BRM.

1.1.5. Variation du rendement de décoloration du BRM :

Au démarrage du BRM, la décoloration a été directement élevée et a atteint 90%. A un temps de rétention hydraulique (TRH) d'environ 3 jours, la performance de décoloration était comprise entre 90 et 99% avec une valeur moyenne de 97.18% et une nette différence entre les valeurs de l'absorbance du perméat et celles de l'effluent d'alimentation(**Fig.4**). La performance de décoloration a baissé à 77.86% suite à la réduction du TRH à 1 jour à une charge organique de 2 g DCO/l/j (**Fig. 4**). Toutefois, l'élimination de la couleur atteint 100% à la fin de cette période de fonctionnement et même à un TRH réduit à 1 jour le perméat produit était visuellement incolore.

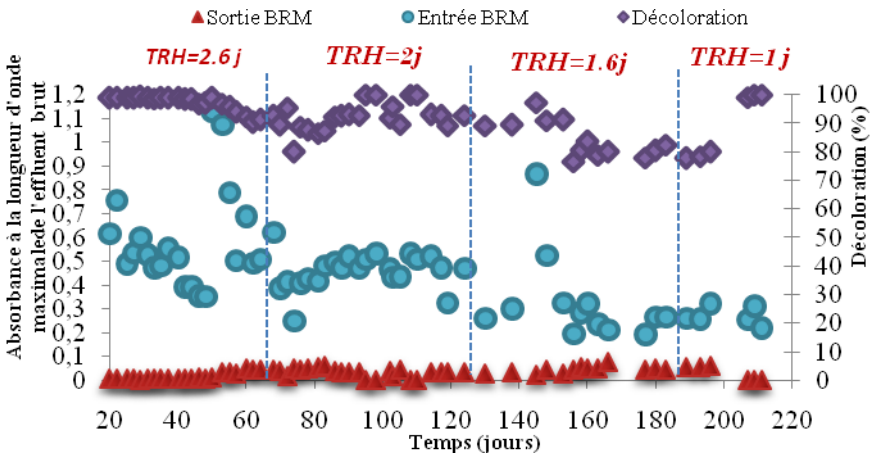


Fig. 4: Evolution de la performance de décoloration au cours du traitement par BRM.

1.2. Etude de la valorisation énergétique des boues de stations d'épuration :

Dans le contexte actuel, les voies d'élimination des boues d'épuration des eaux usées sont soumises à des contraintes multiples, notamment sociales, sanitaires et réglementaires. Il devient donc nécessaire de trouver des traitements plus performants permettant de réduire davantage la production de boues, tout en assurant la qualité des boues. Parmi les différents scénarios existants, le plus intéressant, semble être un couplage entre une digestion anaérobie et une valorisation agricole.

En effet, la digestion anaérobie des boues est un procédé connu pour stabiliser les boues (réduction d'environ 50% de la quantité de boues), tout en produisant un biogaz, riche en méthane, valorisable sous forme d'énergie. Cependant, dans le cadre de la digestion de boues activées, l'étape limitante est l'hydrolyse enzymatique permettant de réduire les polymères en monomères simples facilement dégradables. L'idée pour améliorer les performances de la digestion anaérobie est donc de réaliser un couplage avec un procédé physico-chimique de lyse cellulaire. Le but de ce traitement est de réaliser l'hydrolyse avant la digestion anaérobie.

Des technologies sont actuellement à l'étude pour tenter de lever la biodégradabilité de la matière particulaire de la boue. Ces techniques peuvent être basées sur des traitements mécaniques (ultrason, broyage, haute pression), oxydatifs (ozone, peroxyde d'hydrogène), chimiques (ajout d'acides ou de produits alcalins) ou thermiques.

C'est dans ce cadre que l'objectif principal de ce travail était l'étude de la désintégration (hydrolyse) des boues activées par deux méthodes: l'hydrolyse thermo-alcaline (TA) et l'électro-oxydation avancée (EO). Pour chaque technique, des tests de solubilisation et de biodégradabilité anaérobie (mésophile et thermophile) ont été réalisés afin de déterminer le traitement optimal et d'essayer de comprendre les effets induits par ces traitements.

1.2.1. Désintégration des boues activées :

Pour cette partie deux méthodes de désintégration ont été envisagées: l'hydrolyse thermo-alcaline et l'électro-oxydation avancée.Le traitement thermo-alcalin (TA) est une méthode de désintégration des boues la plus courante, il s'agit de l'intégration de la température avec un agent chimique (NaOH). Pour la méthode d'électro-oxydation (EO), nous avons appliqué la réaction de Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2). Pour ce travail, nous avons choisi la génération des ions Fe^{2+} dans le milieu réactionnel à l'aide d'une anode en fer solubilisée par l'application d'un courant électrique. Les conditions opératoires de chaque méthode ont été optimisées durant une étude antérieure. Le but de cette partie est d'étudier l'effet de ces deux méthodes de désintégration sur les caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et parasitologiques de boues activées. Le **tableau 2** comporte les caractéristiques physico-chimiques des boues brutes prétraitées par TA et EO.

Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques des boues brutes etprétraitées par TA et EO.

Paramètres	Boue brute	Boue prétraitée par TA	Boue prétraitée par EO
pH	7,10	8,93	6,98
DCO totale (g/l)	6,92	4,71	4,74
DCO soluble (g/l)	0,30	0 ,82	0,94
DBO_5 (g/l)	3	-	-
MS (g/l)	6,60	4,27	4,17
MV (g/l)	3,40	2,85	2,58
MES (g/l)	4,22	3,32	3,24
MVS (g/l)	3,39	2,55	2,74
Azote (mg/l)	175	212,8	260,4
Taux de solubilisation DCO (%)	4,33	17,41	19,83

Le pH est un paramètre essentiel pour une désintégration optimale des boues. Il varie en fonction de la méthode de désintégration utilisée. Ainsi, le pH des boues à désintégrer a été ajusté à 10 et à 3 pour TA et EO, respectivement. Après ces prétraitements le pH des boues passent à des valeurs de l'ordre 8,93 et 6,98, respectivement. On remarque alors que les boues électro-oxydées ayant un pH neutre sont aptes à être traitées biologiquement sans correction du pH.

Les résultats de la DCO et de la MES montrent l'effet des prétraitements sur la désintégration des boues. Ainsi, on note une augmentation de la DCO soluble des boues prétraitées par rapport aux boues brutes. De plus une diminution de la MES a été observée durant les deux prétraitements. Pour une comparaison fiable entre les deux méthodes de désintégration, nous avons calculé le pourcentage de solubilisation de la DCO après chaque prétraitement. Ainsi, on note que le meilleur taux (19,83%) a été obtenu lors de la désintégration par EO. Nos résultats confirment l'efficacité des procédés d'oxydation avancée pour la désintégration des boues activées.

Les analyses menées sur les fractions organiques solubles et particulaires des boues au cours de l'hydrolyse par TA et EO nous ont permis de mettre en évidence une évolution de la répartition de la matière organique. Ainsi, le pourcentage de solubilisation de la DCO a montré une augmentation en fonction du prétraitement utilisée. Or, la matière organique solubilisée suite à untraitement peut être de nature intracellulaire ou extracellulaire. La seule détermination de laconcentration en DCO, ou en protéines, de la fraction soluble, est insuffisante pour mettre enévidence une lyse des microorganismes. Ainsi, peu d'études ont été réalisées sur les effets dela désintégration sur la flore microbienne des boues. Pour cette raison, nous avons focalisé sur l'analyse microbiologique des boues désintégrées afin de comprendre le phénomène de l'hydrolyse et de qualifier hygiéniquement les boues prétraitées.

La désintégration des boues activées par TA et EO a conduit à un pourcentage de solubilisation de la matière organique de 17,4% et 19,8%, respectivement. Ce pourcentage est seulement 4,3% dans les boues brutes (**Tableau 2**). En effet, les boues électro-oxydées ont montré un pH neutre ce qui favorise leur traitement biologique sans correction du pH. D'après les analyses microbiologiques et parasitologiques, nous avons noté une élimination de coliformes de l'ordre 3,54 U log et 2,43 U log, par TA et EO, respectivement. Alors pour les *Pseudomonas*, une réduction de l'ordre 1 U log a été observée pour les deux prétraitements. Concernant les résultats du dénombrement des œufs d'helminthes et des kystes de protozoaires, nous avons enregistré des réductions importantes dans le cas des boues électro-oxydées. Ces résultats confirment bien la lyse cellulaire des microorganismes par traitement TA et EO, et par conséquent la solubilisation de la matière intracellulaire au cours du prétraitement.

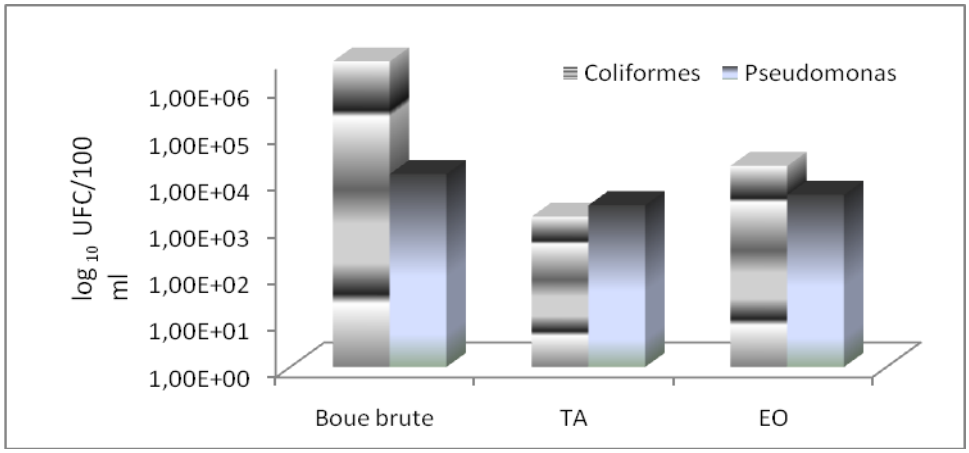


Fig. 5: Les coliformes totaux et les *Pseudomonas* dénombrés avant et après désintégrationdes boues par la méthode thermo-alcaline (TA) et électro-oxydation (EO).

1.2.2. Etude de la digestion anaérobie :

L'étude de la digestion anaérobie des boues brutes et prétraitées a montré que l'étape de désintégration par TA ou EO accélère le processus de la digestion anaérobie. Ainsi, nous avons noté que les rendements en biogaz des échantillons prétraités ont été améliorés par rapport aux boues brutes. Les rendements ont passé de 0,63 à 1,1 et 1,46 l biogaz/g MV pour les boues prétraitées par TA et EO, respectivement (**Fig. 6**). Ce résultat montre bien que l'étape de désintégration par TA ou EO a un effet positif sur le processus de méthanisation en favorisant la production du biogaz. Ainsi, nous avons remarqué que le rendement maximal est obtenu dans le cas des boues prétraitées par EO avec une augmentation de 231% (digestion mésophile) par rapport aux boues brutes. En revanche, malgré la lyse cellulaire engendrée par le traitement TA, la biodégradabilité anaérobie des boues n'est pas très améliorée par rapport au traitement EO, que ce soit en condition mésophile ou thermophile (**Fig. 6**).

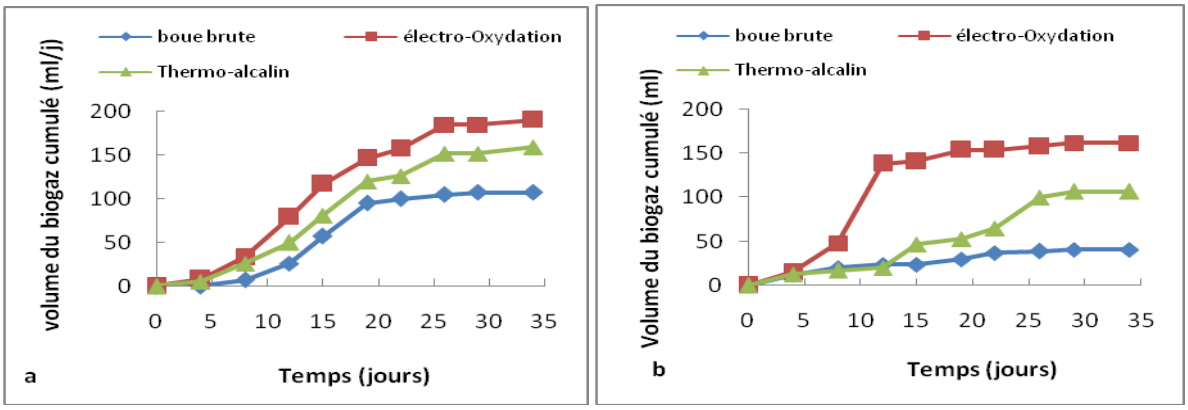


Fig. 6: Cinétique de la production cumulée en biogaz lors de la fermentation en batch des boues brutes et prétraitées en conditions mésophile (a) et thermophile (b).

Les analyses microbiologiques et parasitologiques des digestats de boues brutes et prétraitées ont montré une amélioration de la qualité qui était meilleure en condition thermophile. En effet, la digestion thermophile est plus rapide que la digestion mésophile puisque les taux biochimiques de réaction augmentent avec l'augmentation de la température. Elle permet aussi une amélioration de la déshydratation et une augmentation de la destruction d'organismes pathogènes. Cependant, l'utilisation des températures thermophiles demande plus d'énergie et elle donne un surnageant de qualité inférieure avec de grandes quantités de matières solides dissoutes et un plus haut potentiel d'odeur. En plus, les bactéries thermophiles sont plus sensibles aux fluctuations de la température que les mésophiles. D'après l'ensemble de ces résultats, et de point de vu rendement en biogaz et stabilité, le prétraitement EO s'avère intéressant pour la désintégration des boues avant la digestion mésophile.

Enfin, l'utilisation de l'EO comme prétraitement semble, à première vue, économiquement réalisable: l'amélioration de la production de biogaz occasionnée par le prétraitement pouvant suffire à prétraiter les boues. De plus, le couplage EO-digestion anaérobie peut permettre de

réduire les coûts d'élimination des boues. Toutefois, il serait nécessaire de réaliser une étude du couplage à une échelle plus importante (semi-pilote) afin de vérifier cette conclusion et de réaliser une étude de coûts plus approfondie.

1.3. Essais de traitement fongique des effluents de tanneries: Effets sur la pollution organique et minérale :

Nous rappelons qu'avec l'industrialisation croissante et le développement technologique, la pollution des eaux est devenue une préoccupation majeure des autorités sanitaires nationales et internationales. Les effluents de l'industrie du cuir sont classés comme les plus polluants parmi tous les rejets industriels puisqu'ils génèrent des concentrations élevées de substances organiques et inorganiques causant des problèmes de pollution. Dans ce contexte, plusieurs recherches ont porté sur l'élimination des polluants des eaux usées des tanneries en utilisant des moyens physico-chimiques et/ou biologiques. Les deux voies ont toujours montré des limites, soit d'un point de vue coût et c'est le cas des traitements physico-chimiques qui sont énergivores et qui ne font que déplacer la pollution et non pas l'éliminer, soit d'un point de vue toxicité vis à vis de la flore épuratrice dans le cas des traitements biologiques.

Les champignons ont été largement utilisés pour traiter les effluents et ont été même utilisés dans le cas des tanneries puisqu'ils jouent un rôle majeur dans la réduction de la pollution grâce à leurs aptitudes à produire une grande variété de protéines extracellulaires, d'acides organiques et d'autres métabolites. De plus, ils ont une capacité à adsorber les polluants et à s'adapter aux contraintes environnementales sévères. De ce fait, ce travail a porté sur l'étude de la capacité de différentes souches de champignons, tels qu'*Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* et autres souches isolées, à réduire la pollution minérale et organique des effluents de tannerie, effluent final à pH basique et effluent de tannage chargé en sels et dont le pH est acide (**Tableaux 3 et 4**).

Tableau 3: Composition organique des échantillons de l'effluent final et de l'effluent de tannage.

Paramètres (Unité)	Effluent final	Effluent de tannage	NT 106.02
pH	9,34 ± 0,2	3,77 ± 0,2	6,5 - 6,8
CE (mS/cm)	19,72 ± 1,2	63,41 ± 5,2	-
Salinité (g/l)	15,06 ± 1,5	53,9 ± 4,9	-
DCO (g/l)	4,07 ± 0,3	2,69 ± 0,2	1
DBO_5 (g/l)	2,5 ± 0,2	1,25 ± 0,15	0,4
DBO_5 / DCO (g/l)	0,61 ± 0,05	0,46 ± 0,03	-
MS (g/l)	0,239 ± 0,01	0,726 ± 0,05	-
MV (g/l)	0,015 ±0,001	0,168 ± 0,02	-
Mm (g/l)	0,224 ± 0,01	0,558 ± 0,05	-
MES (mg/l)	3,9 ± 0,3	5,9 ± 0,5	0,4
MVS (mg/l)	0,95 ± 0,07	0,6 ± 0,05	-
NTK (mg/l)	252 ± 20	120,4 ± 10	100
NH_4^+-N (mg/l)	172,2 ± 15	117,6 ± 10	100
H_2S (mg/l)	720 ± 65	70 ± 6,0	-
Prot. solubles (g/l)	0,059 ± 0,005	0,051 ± 0,005	-
Matière grasse (%)	0,885 ± 0,07	0,318 ± 0,02	-

Tableau 4: Composition minérale des différents ions métalliques dans l'effluent final et de l'effluent de tannage, en comparaison avec les normes tunisiennes de rejet.

	Effluent Final	Effluent de tannage	NT 106.02
Ca (mg/l)	89 ± 8	96,5 ± 9	500
K (mg/l)	887,5 ± 80	276,5 ± 20	50
Mg (mg/l)	1393 ± 140	438 ± 40	200
Na (mg/l)	764 ± 65	352 ± 25	500
Cr (mg/l)	1,0955 ± 0,1	1149,5 ± 115	0,1
Cd (mg/l)	0,0135± 0,001	0,0315 ± 0,002	0,005
Cu (mg/l)	0,0005 ± 0,0001	0,0055 ± 0,0003	0,5
Fe (mg/l)	0,5705 ± 0,05	1,4155 ± 0,15	1
Mn (mg/l)	0,0045 ± 0,0005	0,112 ± 0,02	0,5
Ni (mg/l)	0,058 ± 0,006	0,023 ± 0.003	0,2

Les résultats ont montré, après optimisation des différents paramètres affectant la croissance et la production d'enzymes, que toutes les souches utilisées étaient capables non seulement de croître sur ces effluents, à différentes proportions, mais aussi de diminuer la charge polluante organique (**Fig. 7**).

Il y a eu également une réduction de la pollution minérale par phénomène d'adsorption. Ceci a entraîné une réduction importante de la toxicité élevée des effluents de départ (**Fig. 8**). Cependant, l'efficacité d'élimination de cette pollution dépend en grande partie de la sensibilité des espèces et de leurs systèmes enzymatiques spécifiques puisqu'elles ont manifesté des abattements différents d'une souche à une autre. Ces résultats encourageants vont permettre l'extrapolation à une échelle plus importante. D'autre part ces résultats fructueux ont fait l'objet d'un article en cours de préparation.

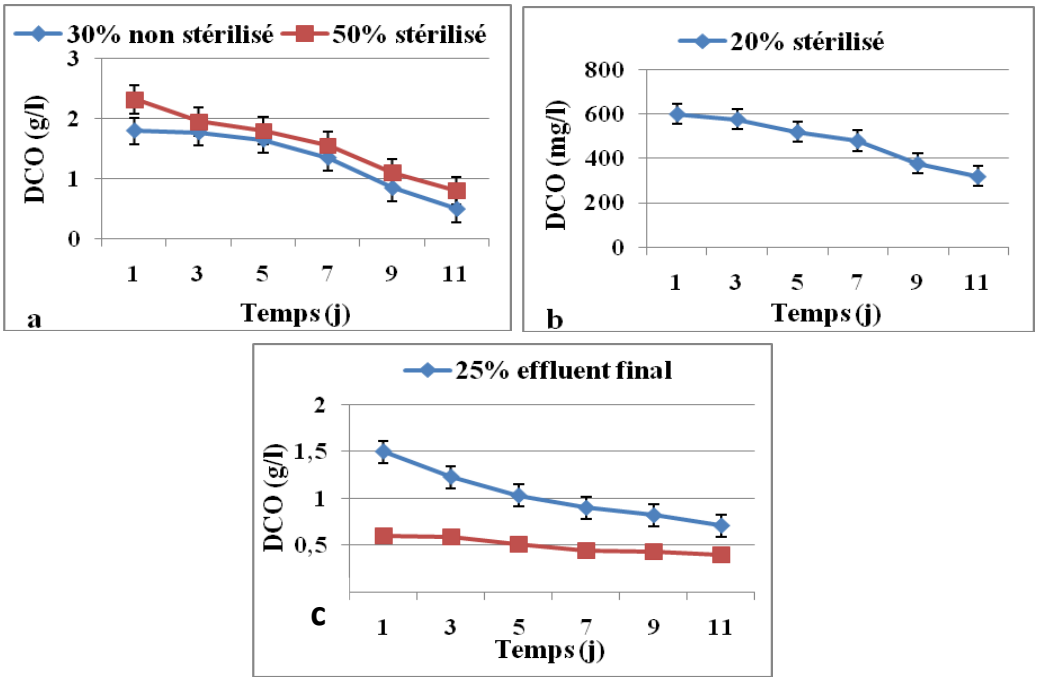


Fig. 7: Suivi de la DCO au cours du traitement de l'effluent final (a) et de l'effluent de tannage (b) par *A. niger* et de l'effluent final (c) par *P. chrysosporium*.

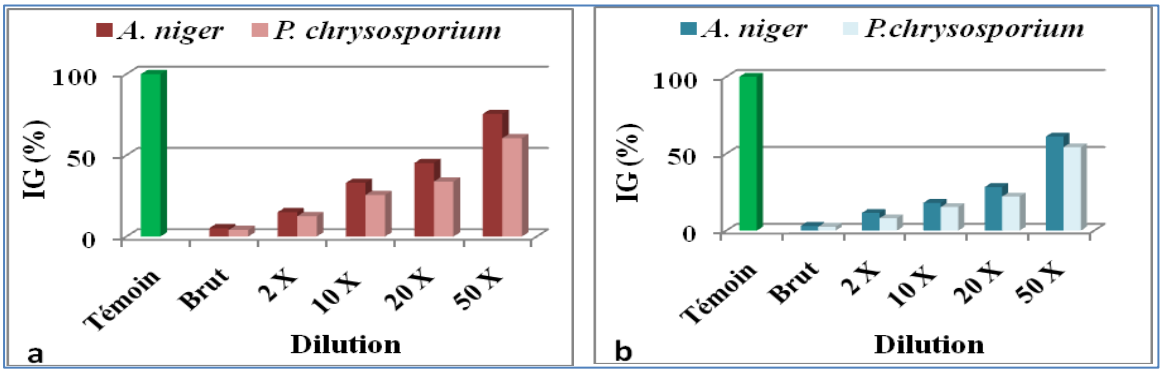


Fig. 8: Test de phytotoxicité: détermination de l'IG (%) des graines de tomate cultivées sur l'effluent final (a) et l'effluent de tannage (b), traités par *A. niger* et *P. chrysosporium.*

1.4. Valorisation des sous-produits de l'olivier: cas des feuilles :

1.4.1. Les extraits de feuilles d'oliviers réduisent la toxicité du Bisphénol :

Dans cette étude, nous avons étudié les effets protecteurs descomposés issus de feuilles d'olivier, contre la toxicité induite par différentes doses de bisphénol A (BPA) dans des rats jeunes. Nous avons montré qu'à forte dose, le BPA provoque un dysfonctionnement de la thyroïde chez les jeunes rats. Les analyses ont permis de détectercertains produits dérivés toxiques du bisphénol A dans le sérum des rats jeunes. Ce fait pourrait expliquer le dysfonctionnement de la thyroïde.

Les hormones thyroïdiennes, la thyroxine (T4) et la tri-iodothyronine (T3), ont des fonctions diverses. En particulier, ils sont essentiels pour le développement du cerveau et permettent le contrôle de la croissance par la stimulation des hormones de croissance. Par ailleurs, l'hypothyroïdisme, en tant qu'un mécanisme de disfonctionnement des thyroïdes, peut être à l'origine du retard de croissance chez les rats jeunes. L'association d'un traitement par des extraits de feuilles d'oliviers chez les rats traités par le BisphenolA,a provoqué un rétablissement de la croissance corporelle ainsi qu'une amélioration à l'échelle histologique des thyroïdes (**Fig. 9**).

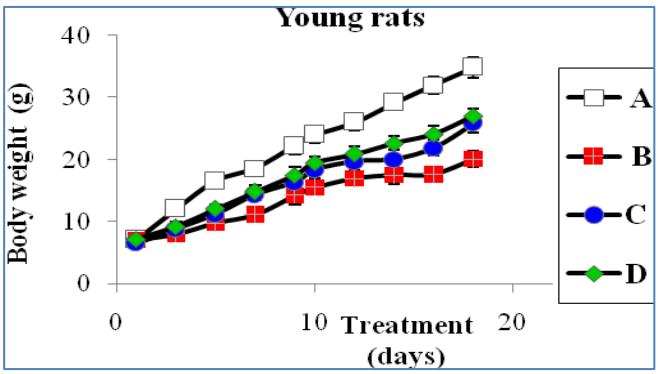


Fig. 9: Evolution du poids corporel (g/jour), contrôle (group A), bisphenol A (group B), bisphenol A et oleuropeine (group C); bisphenol A et hydroxytyrosol (group D).

1.4.2. Pouvoir antidiabétique des extraits de feuilles d'oliviers :

Le diabète sucré (DM) est un trouble métabolique causée par une carence dans la sécrétion de l'insuline. La maladie se développe avec des complications telles que la modification du métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. L'une des approches thérapeutiques pour diminuer l'hyperglycémie postprandiale est de retarder la digestion et l'assimilation de l'amidon à des stades précoces. L'inhibition de l'α-amylase et de l'α-glucosidase peut aider à réduire l'hyperglycémie postprandiale et par la suite permet de retarder l'absorption du glucose. Ainsi, cette partie a été consacré à l'évaluation de l'effet de l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol sur les enzymes digestives (α-amylase et α-glucosidase) et d'étudier l'effet de ces molécules sur les niveaux de l'adiponectine et de l'insuline chez des rats nourris avec un régime riche en cholestérol.

L'activité inhibitrice de l'α-glucosidase a été étudiée à différentes concentrations en oleuropéine et hydroxytyrosol purifiés à partir des feuilles d'oliviers. Nos résultats montrent une inhibition dose dépendante de l'α-glucosidase (**Fig. 10**). L'hydroxytyrosol atteint la plus forte activité inhibitrice de l'α-glucosidase à 600 µM. Nous avons aussi noté que cette inhibition est plus efficace que celle de l'acarbose connu comme agent antidiabétique. L'oleuropéine s'est avérée être l'inhibiteur le plus faible toutefois son action reste hautement significative à 600 µM (60% d'inhibition).

Les activités inhibitrices de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol contre l'amylase pancréatique ont également été étudiées. A la concentration la plus élevée, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine ne sont pas efficaces avec une inhibition moins de 25% et 10%, respectivement.

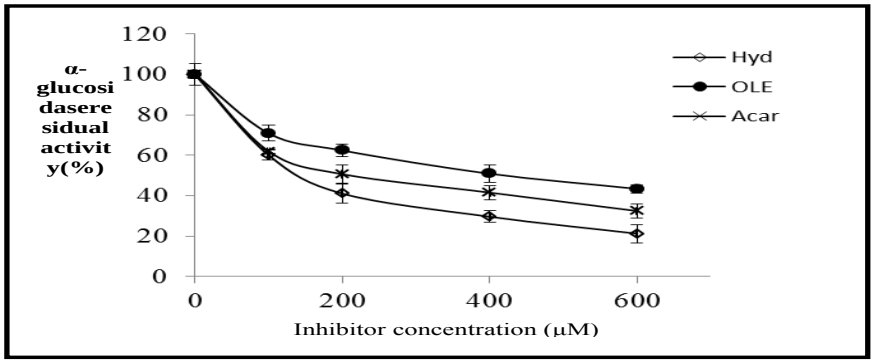


Fig. 10: Effet inhibiteur de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol sur l' α-glucosidase.

1.4.3.Activité anti-cancéreuse des composés issus de l'olivier :

Dans cette partie nous nous sommes intéressés à l'investigation et la compréhension de l'effet anti-cancéreux des composés de l'olivier. En effet, nos expériences ont montré que les extraits des olives présentent un effet inhibiteur de la croissance en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase S chez les lignées cancéreuses HepG2 et Caco-2 (**Fig. 11**). Ainsi, ces résultats indiquent que les extraits des olives peuvent constituer une source naturelle saine de composés, en particulier les polyphénols, ayant une utilisation potentielle dans la prévention de nombreuses maladies.

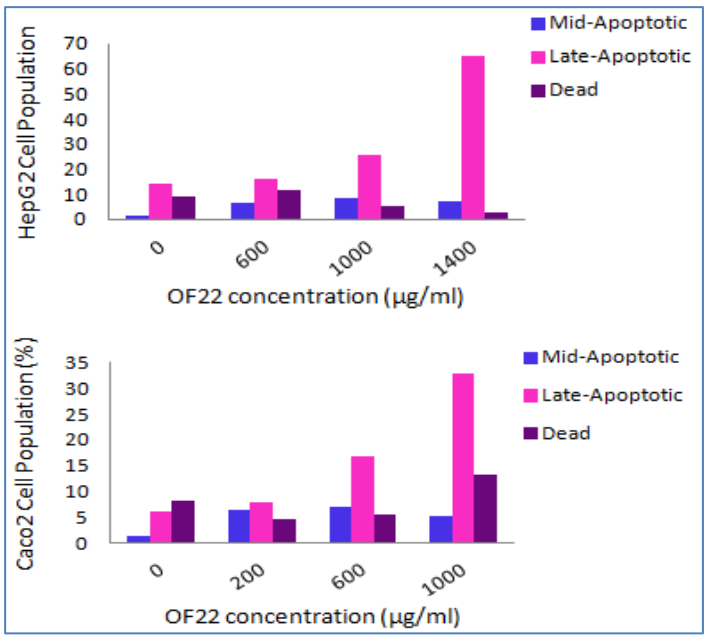


Fig. 11: Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (HepG2 et Caco-2) et induction de la mort cellulaire par les extraits des olives (cas de l'extrait OF22)

1.5. Production de biomasse et de molécules d'intérêt ou élimination de polluants par culture des microalgues :

Les microalgues et les cyanobactéries sont des microorganismes photosynthétiques aquatiques. Elles utilisent la lumière comme source d'énergie, le CO_2 comme source de carbone, l'eau comme donneur d'électrons et les éléments minéraux, pour produire diverses molécules carbonées grâce à la photosynthèse. Certaines espèces peuvent être cultivées en mode mixotrophe, ou encore en mode hétérotrophe à l'abri de la lumière où la matière organique est utilisée comme source de carbone et d'énergie. Les microalgues et les cyanobactéries n'entrent pas en compétition avec les cultures alimentaires usuelles car elles peuvent être cultivées aussi longtemps qu'elles sont exposées à suffisamment de lumière et qu'elles disposent d'une quantité d'eau, de CO_2, et de sels minéraux, adéquate sur une terre non arable et avec une eau inappropriée à l'agriculture traditionnelle, comme l'eau de mer, l'eau saumâtre et les eaux usées. Elles ont une productivité annuelle 5 à 30 fois supérieure à celle des cultures végétales les plus répandues (blé, maïs, soja …etc.). Elles sont capables de produire des quantités d'huiles, de glucides ou de protéines plusieurs fois supérieures à celles des plantes terrestres. La production de biocarburants par des microalgues ne peut être économiquement viable qu'associée à un système de dépollution (consommation de nitrate, ammonium et phosphate, ainsi que de CO_2) et/ou à la production de composés valorisables dérivés de la biomasse. De plus, les microalgues peuvent aussi produire des substances d'intérêt biologique, pharmaceutique, cosmétique ou nutraceutique. Par ailleurs, les conditions climatiques et environnementales de notre pays sont favorables pour la culture des microalgues. Les besoins d'un pays émergent comme la Tunisie en énergie, produits et compléments alimentaires, produits pharmaceutiques et cosmétiques ne cessent de croître. Vu l'impossibilité de couvrir tous ces exigences par nos ressources existantes ou par une agriculture conventionnelle, la culture des microalgues vise à résoudre en partie les besoins Tunisiens.

Différents biotopes Tunisiens (Sources d'eau chaude, Eaux de mer, Saline de Sfax, Sebkha de Chott El-Jérid…etc.) ont été utilisés pour isoler les microalgues en culture pure. L'isolement des microalgues à partir des cultures enrichies a été réalisé selon la technique de dilution décimale et/ou étalement sur milieu solide. Une trentaine de souches microalgales en culture pure, présentant des morphologies et des pigmentations différentes ont été isolées à partir de ces différents échantillons. Les 34 souches isolées ont été criblées pour leur croissance rapide, leur grande capacité de production de lipides ainsi que le profil en acides gras leur lipide adéquat soit pour la production de biodiesel soit comme supplément alimentaire s'il est riche en acides gras polyinsaturés. Seules 12 d'entre elles possèdent simultanément un taux de croissance spécifique supérieur à 0,4 j^{-1} et une teneur en lipide supérieure à 10% (dw).

Trois souches ont été étudiées en détail pour améliorer leur croissance et augmenter leur capacité d'accumulation des lipides pour la production de biodiesel et trois souches pour la production de lipide riche en acides gras polyinsaturés. Les plans d'expériences et models mathématiques (Plackett et Burman, Matrice d'Hadamard, Box-Behnken, NemrodW) ont été

utilisés pour optimiser les conditions de culture de ces souches. L'effet de certains facteurs de stress sur la capacité d'accumulation de lipides par ces microalgues a été également étudié. Il est important de remarquer que jusqu'à présent, les souches identifiées et étudiées appartiennent à de nouvelles espèces ce qui traduit l'énorme biodiversité des microalgues qui restent jusqu'à maintenant non explorées ou exploitées ce qui augmente les chances d'isoler de nouvelles espèces bien adaptées aux conditions environnantes locales.

La souche CTM 20019 isolée de la plage de Sidi Mansour, Sfax et identifiée comme *Picochlorum* sp. Elle est composée de 163 g kg^{-1} de lipides, 225 g kg^{-1} de sucres totaux, 440 g kg^{-1} de protéines et 112 g kg^{-1} de cendre riche en potassium, calcium, fer, magnésium et zinc. Le profil en acides gras des lipides de *Picochlorum* sp. est composé d' acide palmitique (29%), acide linoléique (26.5%), acide linoléique (23.5%), acide hexadecatrienoique (11%) et acide hexadecadienoique (8.5%). Après optimisation des conditions de culture et de la composition du milieu par les plans d'expériences, la croissance de *Picochlorum* sp. augmente de DO_{680nm} = 0.53 à DO_{680nm} = 2.2 et l'accumulation de lipide de 163 g kg^{-1} à 190 g kg^{-1}. Les teneurs en lipides les plus élevées de 570 et 585 g kg^{-1} ont été enregistrées sous carence en phosphate et addition de carbonate de sodium. Sous ces conditions de stress, le profil en acides gras est dominé par les acides mono et poly-insaturés qui sont favorables pour l'alimentation en l'aquaculture. Cependant, sous forte concentration en sel la croissance et la synthèse de lipide sont inhibés et les acides gras sont saturés, favorables donc pour le biodiesel. Cette haute teneur en lipide riche en acides gras essentiels, oméga 6 et oméga 3, classe cette souche sauvage comme prometteuse pour l'alimentation humaine ou en aquaculture ou également pour la production de biodiesel.

La souche microalgale CTM 20023 isolée de la saline de Sfax et identifiée comme *Amphora* sp. montre un profil en acides gras composé de C14:0, C16:0, C16:1, C16:2 et C16:3 à 18,50 ; 24,64 ; 48,76 ; 2,67 et 5,44% w/w respectivement. Elle possède une vitesse de sédimentation rapide de 2.91 m h^{-1} ce qui facilite énormément la récupération de la biomasse par simple décantation. Après optimisation des conditions de culture, le taux de croissance spécifique augmente de 0,149 j^{-1} à 0,262 j^{-1} et al production de biomasse de 465 à 2200 mg L^{-1} (dw) et sa teneur en lipides de 140 à 370 mg g^{-1} (dw). La plus haute productivité en biomasse de 178 mg L^{-1} j^{-1} est atteinte au 10ème jour de culture. La plus haute teneur en lipides de 530 mg g^{-1} (dw) est obtenue sous une carence en phosphate et dont 64% de ses lipides sont saturés. Une première étape de culture dans les conditions optimales permettra une haute productivité en biomasse suivie par une étape de stress avec carence en phosphate qui permettra d'accumuler le maximum de lipides saturés très appropriés pour la production de biodiesel.

La souche CTM 20032 isolée de la saline de Sfax et identifiée comme *Dunaliella* sp. Possède une teneur en lipides de 100 mg g^{-1}, en protéines de 435 mg g^{-1}, en hydrates de carbone de 300 mg g^{-1}, en chlorophylles de 38.8 mg g^{-1}, en carotènes de 18 mg g^{-1} et une teneur polyphenols 83 mg g^{-1}. Les principaux acides gras composant ce lipide sont l'acide Octadécanoique C18:0 48%, l'acide Hexadécatrienoique 16:3 40% et l'acide

Octadecatrienoique 18:3 7.5%. Après culture de 6 jours sous carence en azote et en phosphate, la teneur en lipides augmente de 10% à 54 et 45%, respectivement. Sous carence en azote, le profil en acides gras de *Dunaliella* sp. est principalement composé à 58% du C16:0, 20.5% du C18:0 et 15% du C18:1. Alors que sous carence en phosphate son profil est composé à 80% du C16:0, 8.5% du C18:0 et 12.5% du C18:1. Ces conditions de stress oriente *Dunaliella* sp. à accumuler plus que 95% de son lipide sous forme de triglycérides saturées et monosaturées ce qui est favorable pour la production de biodiesel.

Une étude sur le développement des procédés d'extraction et estérification des lipides pour la production de biodiesel a été effectuée. L'extraction des lipides à partir de biomasse humide traitée par la micro-onde avant l'extraction par la méthode de Bligh and Dyer modifié par Schmid (2010) a donné les meilleurs résultats. Après l'optimisation des paramètres d'extraction, une comparaison entre la trans-estérification directe sur la biomasse microalgale fraîche et extraction des lipides puis une trans-estérification a été effectuée pour les trois souches. La trans-estérification directe parait la méthode la plus adéquate pour la production de biodiesel en diminuant les étapes d'extraction et le coût. Après l'extraction des lipides, les résidus de la biomasse microalgale restent riches en biomolécules (protéines, sucres, polyphénols, flavonoïdes, tanins condensés et anthocyanes ….) qu'il faut valoriser.

Le développement d'un procédé de culture en deux étapes : une première phase de croissance en continu dans un réacteur 15 litres de la souche *Picochlorum* sp. pour produire de la biomasse. Une deuxième phase en batch sous conditions stressantes pour produire des acides gras polyinsaturés. Cette culture en deux phases est en cours de finalisation, elle a permis d'améliorer considérablement la productivité de biomasse et d'orienter l'accumulation des acides gras polyinsaturés sous le stress.

2. Réhabilitation de sites pollués par bioremédiation :

2.1. Biodégradation des hydrocarbures: Cas des environnements terrestres et marins; Production et caractérisation des biosurfactants :

Ce projet adhère l'objectif général du Laboratoire qui est le développement de procédés de traitement et de valorisation de rejets et la réhabilitation de sites pollués par bioremédiation. Dans ce contexte, nous nous intéressons à des effluents industriels et environnements contaminés par des hydrocarbures et des mercaptans variés (mercaptans issus de l'industrie de transformation du phosphate; hydrocarbures aromatiques, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs); hydrocarbures aliphatiques; hydrocarbures complexes, comme le pétrole brut, l'huile de moteur et le mazout…).

En plus de nos études réalisées sur des eaux de production de pétrole, des effluents riches en mercaptans de l'industrie de transformation du phosphate (Groupe Chimique Tunisien: GCT), nous nous sommes intéressés dans cette partie, à l'étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers, en particulier les HAPs, et à la production et la caractérisation des biosurfactants originaux par des bactéries hydrocarbonoclastes issues de différents biotopes:

des sols contaminés par des hydrocarbures, des phosphogypses produits par le GCT, et des environnements marins pollués (ports tunisiens)…

Les HAPs présentent un risque toxicologique important même à des faibles concentrations, notamment par leurs propriétés cancérigènes et/ou mutagènes. De plus, les HAPs sont peu biodégradables car faiblement biodisponibles, ce qui les rend persistants dans l'environnement. Ainsi leur sort dans l'environnement est devenu un sujet préoccupant.

En vue d'obtenir des consortiums actifs sur les HAPs, différentes cultures par enrichissement ont été réalisées à partir des sols contaminés par des hydrocarbures et du phosphogypse, à des salinités et des températures variées. Trois consortiums actifs sur le phénanthrène, un HAP à 3 noyaux benzéniques, ont été retenus : CSMP1 (à 10 g/l NaCl), CSMP2 (à 30 g/l NaCl) et CSMGP1 (à 30 g/l NaCl). Le consortium CSMP1 a pu dégrader jusqu'à 99% de phénanthrène (200 mg/l), après 7 jours d'incubation à 37 °C et 180 rpm. Des intermédiaires de biodégradation ont été également identifiés par GC-MS (**Fig. 12**). CSMP1 est capable de tolérer des concentrations élevées en phénanthrène jusqu'à 2 g/l, et des salinités élevées jusqu'à 50 g/l NaCl. Il est également capable de croître sur d'autre HAPs tels que le fluoranthène et le naphtalène, ainsi que sur d'autres hydrocarbures complexes comme le pétrole brut. Ce consortium demeure intéressant pour envisager son application sur des sols contaminés par des hydrocarbures.

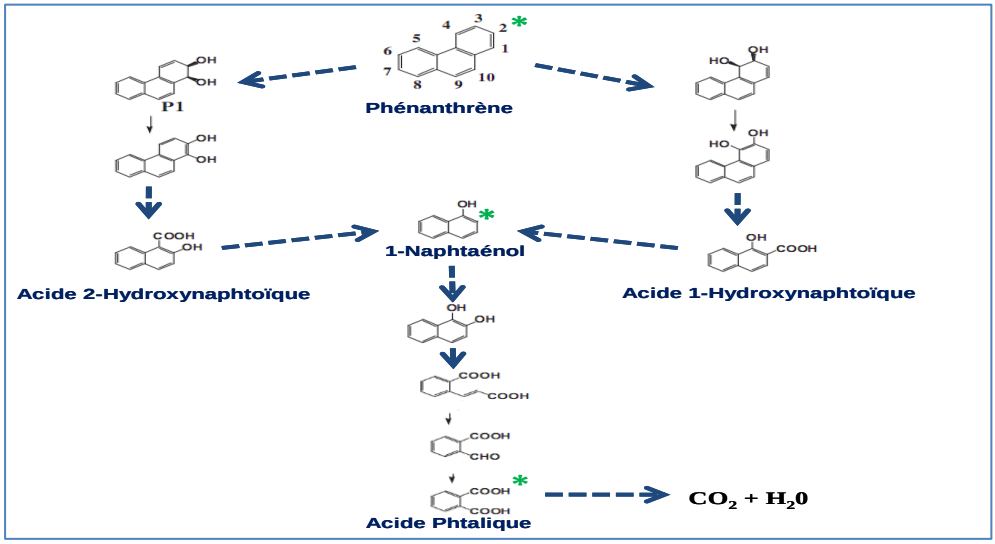


Fig. 12: Voie de biodégradation du phénanthrène par le consortium CSMP1.

Des souches bactériennes W10, S6 et Y7, ont été isolées sur le phénanthrène, utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, à partir du consortium CSMP1, CSMP2 et CSMPG1, respectivement. D'autres cultures par enrichissement actives sur le pyrène et sur le naphtalène sont en cours d'élaboration.

La soucheW10 est aérobie et mésophile. Elle possède une température optimale de croissance de 37 °C, une concentration optimale en NaCl de 10 g/l et un pH optimum de croissance égal à 7. Elle se présente sous forme de bacilles mobiles, souvent des diplobacilles. Sa membrane cellulaire est de type Gram négatif. Elle possède des activitésoxydaseet catalase. La souche W10 est membre du genre*Pseudomonas*, avec l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, l'espèce la plus proche (Similarité de l'ARNr 16S de 99,1%) (**Fig. 13**). Moyennant les analyses GC-MS, nous avons confirmé que la souche W10 est capable de dégrader en aérobiose 80% de cet HAPà 200 mg/l,après 30 jours d'incubation à 37 °Cet 180 rpm. Elle est aussi capable de réduire la tension de surface de 56,1 à 42 mN/m, après 4 jours d'incubation à 37 °C et 180 rpm.

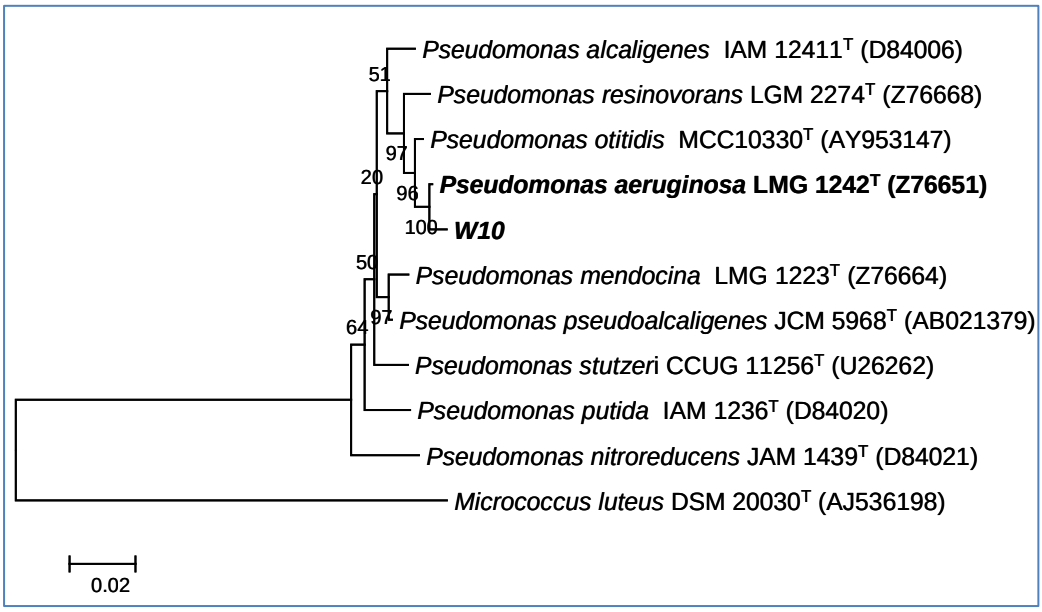


Fig. 13: Dendrogramme montrant la position phylogénétique de la souche W10, en se basant sur les analyses de l'ARNr 16S.

Suite à des tests de production de biosurfactant(s) de la souche W10 sur différents hydrocarbures, l'huile d'olive a montré une meilleure réduction de tension de surface, après 2 jours d'incubation. Une production de 2 g de biosurfactant brut/l de milieu de culture a été obtenue, après 2 jours d'incubation à 37 °C et 180 rpm. Ce biosurfactant brut est capable de réduire la tension de surface de l'eau de 72 mN/m à 31 mN/m, en présence de sa CMC (Concentration Micellaire Critique) qui est de 0,04% (m/v). Le produit a montré des stabilités intéressantes de la tension de surface, de l'indice d'émulsification et du déplacement d'huile dans une gamme de température (4-100 °C) et de pH (2-12). Ce biosurfactant possède également une tolérance élevée vis-à-vis du NaCl (2-15%, m/v). Des essais d'applications de ce

biosurfactant par solubilisation des structures polyaromatiques et mobilisation des hydrocarbures dans des sols contaminés ont été débutés, montrant ses capacités prometteuses par rapport à des surfactants chimiques.

Les rejets d'origines urbaine, agricole et industrielle altèrent les communautés et affectent les organismes qui les composent. Les zones portuaires, qui comptent parmi les régions côtières les plus polluées, menacent les communautés benthiques et pélagiques. Le même constat est fait pour le littoral Sud de Sfax, y compris les ports dont la pollution presque généralisée menace sérieusement les ressources naturelles existantes dans la région (les sols, les aquifères et l'écosystème marin). En effet, la croissance rapide du commerce mondial, par les voies maritimes, a entraîné au cours des siècles, la transformation et le développement des ports côtiers. Ce développement rapide a engendré des problèmes, aussi bien au niveau technologique qu'au niveau environnemental. Dans ce cadre, Nous avons orienté nos investigations vers le milieu marin contaminé par des hydrocarbures, en particulier certains ports tunisiens (de pêche, de commerce). En plus du potentiel biodégradatif de différentes structures d'hydrocarbures, le caractère halophile ou halotolérant est recherché pour isoler des souchesbactériennesmarineshydrocarbonoclastes originales, à potentialités biotechnologiques.

Une première étude a porté sur deux échantillons des eaux de mer contaminées par les hydrocarbures, l'un provenant du port de pêche et l'autre du port de plaisance (Chott Kerkennah) de la ville de Sfax, outre un échantillon de sédiment contaminé ayant comme origine le port de pêche de Sfax. Pour mieux évaluer la pollution de ces échantillons, une détermination d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques a été établie.

La caractérisation physico-chimique de ces échantillons comporte la détermination du pH, de la conductivité électrique, de la salinité, de la température, du carbone organique total (COT), de la demande chimique en oxygène (DCO), et de la demande biologique en oxygène (DBO_5), le dosage de l'azote total, des hydrocarbures totaux, de certains éléments minéraux et de quelques métaux. Cette caractérisation montre la contamination des échantillons étudiés par des micropolluants organiques et inorganiques. Ceux-ci sont d'excellents traceurs de la pollution urbaine et industrielle et ils font partie des composés les plus toxiques étant donné leur faible biodégradation. En outre, il s'est avéré que les échantillons des eaux de mer contaminées et de sédiment testés présentent une contamination très marquée par des hydrocarbures variés.

Une nouvelle souche bactérienne aérobie FLU5, ayant des capacités biodégradatives sur le fluoranthène, un HAP composé de 3 noyaux aromatiques et d'un cyclopentane, a été isolée à partir des eaux de mer du port de pêche de Sfax. La souche FLU5 est Gram+, mobile, oxydase+, catalase+, mésophile, halotolérante et se présente sous forme de bacilles. Les caractérisations phénotypiques et phylogénétiques montrent que la souche FLU5 est membre du genre *Bacillus* et qu'elle est étroitement reliée à l'espèce *Bacillus stratosphericus* (Similarité de l'ARNr 16S de 99.66%). Cette souche montre des potentialités biodégradatives intéressantes

sur le fluoranthène, en l'absence de l'extrait de levure et en présence de 30 g/l NaCl. Les analyses GC-MS montrent que la souche FLU5 est capable de dégrader 44 ,5% du fluoranthène (100 mg/l), au bout de 30 jours d'incubation (**Fig. 14**). Elle pourrait aussi synthétiser un biosurfactant capable de réduire la tension de surface et rendre ainsi les HAPs mieux accessibles à l'attaque microbienne. La souche FLU5 montre également une capacité remarquable de croître sur une large gamme d'hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et complexes (Octane, BTEX, acide gallique, acide gentisique, pyrène, pétrole brut, mazout,…), utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie.

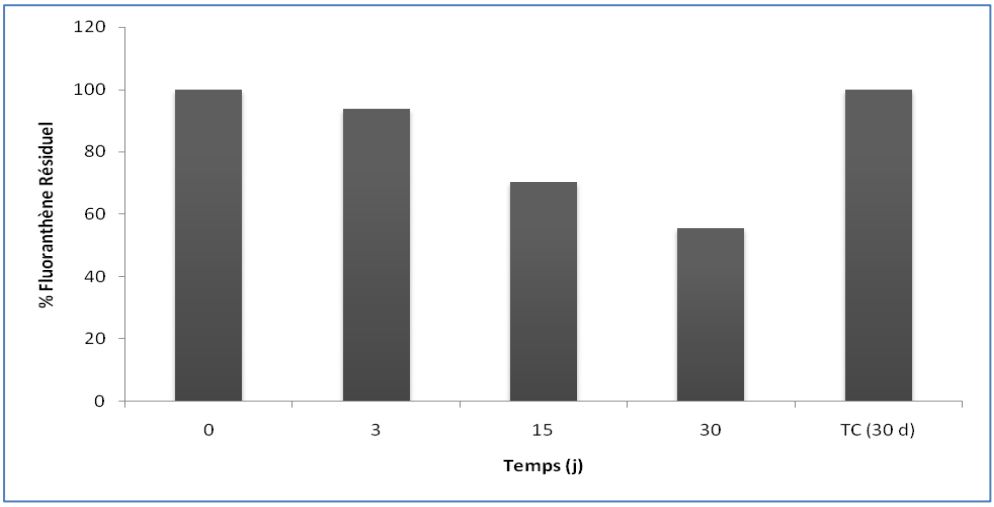


Fig. 14: Pourcentage du fluoranthène résiduel dans les cultures de la souche FLU5 en fonction de différents temps d'incubation, à 37 °C et 180 rpm.

2.2. Bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures :

Les polluants des sols sont très variés et sont aussi souvent toxiques pour l'homme. A l'instar des pesticides, des phtalates, de solvants chlorés, de l'azote, de certains éléments traces comme le cuivre, le mercure ou l'argent, les polluants peuvent à la fois être présents naturellement dans les sols ou être le résultat d'activités humaines. La pollution des sols par l'activité industrielle comme le raffinage des produits pétroliers génère un risque environnemental et sanitaire pour l'homme et la biodiversité. Plusieurs technologies de dépollution ont été développées: chimiques, physiques ou biologiques. Les méthodes biologiques ont montré plus d'efficacité par rapport aux techniques physicochimiques et thermiques qui, de plus, sont plus coûteuses. Les méthodes biologiques utilisent l'action de microorganismes ou de végétaux pour dépolluer les sols. Il s'agit donc de la bioremédiation. Jugée rentable et efficace contre l'élimination de composés pétroliers et notamment des hydrocarbures BTEX, la bioremédiation est de plus en plus utilisée. Plusieurs techniques de bioremédiation sont connues. Grâce à une dégradation par la microfaune ou d'autres processus naturels (dilution, absorption, évaporation), la teneur en polluants des sols peut diminuer.

Réalisée par l'intermédiaire d'actions de microorganismes ou de plantes, cette dégradation naturelle est appelée l'atténuation naturelle. Des microorganismes exogènes, parfois génétiquement modifiés, peuvent être nécessaires à la dépollution de sols. Cette technique, la bio-augmentation, repose sur la capacité de certains microorganismes à minéraliser, décomposer ou transformer des contaminants en substances moins nocives. Pouvant être employée isolément ou simultanément, la bio-stimulation peut par exemple consister en l'apport de nutriments et de surfactants accompagnés d'oxygène dans le sol. En effet, la biodégradation des hydrocarbures dépend de nombreux paramètres comme la température ou la présence d'eau dans les sols. Ainsi, il est important de connaître la structure et la nature du sol. L'humidité, la salinité, le pH, le taux d'oxygène ainsi que la composition chimique sont des paramètres à suivre. En effet, ceux-ci doivent permettre une efficacité optimale des microorganismes et donc se assembler au maximum des conditions optimales de croissance de ces microorganismes. Enfin, l'apport en nutriments ainsi que la disponibilité en oxygène peuvent faciliter la biodégradation des hydrocarbures.

2.2.1. Suivi de procédé de dépollution des terres usagées de la SOTULUB :

Ce travail consiste au suivi de la performance de la station de dépollution par bioremédiation des terres polluées par des hydrocarbures à la SOTULUB dans le cadre d'une convention entre la SOTULUB et le Laboratoire LBPE- CBS.

Les analyses ont montré que les terres stockées à l'usine (SOTULUB) sont chargées en hydrocarbures avec une concentration moyenne de 108 g/ kg. L'objectif de la station est de minimiser au maximum ce taux d'hydrocarbures afin de détoxifier ces terres usagées. Pour optimiser les conditions de traitement biologique des terres usagées, nous avons prélevé une quantité de la terre usagée de la SOTULUB (**Fig. 15**), puis nous l'avons mélangé avec des déchets verts, à raison de 20% (v/v), afin d'améliorer l'aération et la surface du contact (bactérie-substrat). Ainsi, nous avons divisé ce mélange en deux partiesà une même hauteur (20 cm). Chaque andain a subit un traitement spécifique:

- Andain A: Humidification avec de l'eau de robinet.
- Andain B: Ajout du phosphore, et d'une source d'azote (ammonitre), comme nutriments (Biostimilation) et l'humidification a été effectuée avec les eaux usées de la SOTULUB, traitées dans un lit bactérien (Bioaugmentation).

Ces 2 andains ont subi des retournements réguliers à une fréquence de 2 fois par semaine. L'humidification des andains A et B a été effectué, respectivement, à l'aide de l'eau de robinet et la sortie de lit bactérien.

Fig. 15: Photo de prélèvement des terres usagées

de la SOTULUB à l'aide d'une tractopelle

L'analyse des hydrocarbures (HC) dans ces terres polluées (**Fig. 16a**) fait ressortir une teneure de 46 g /Kg de sol, après traitement pour l'andain A, soit un abattement de l'ordre de 57% des HC; et 1,08 g/Kg de sol pour l'andain B, soit un abattement de l'ordre de 99% des HC. Ainsi, la détermination de la biodégradation aérobie des hydrocarbures dans les conditions naturelles (andain A) nous a permis de constater que les hydrocarbures sont faiblement biodégradables par rapport à l'andin B qui est traité par l'application de la bioaugmentation et de la biostimilation. L'andain A a été humidifié, aéré, et amélioré du point de vu structure par l'ajout des déchets verts. Donc on a favorisé un milieu adéquat aux bactéries intrinsèques des terres usagées. Ceci a permis une biodégradation de la matière organique mais avec une vitesse lente. Par contre, dans l'andain B, la biodégradation a été plus rapide en raison de la bioaugmentation avec des bactéries acclimatées pour la dégradation des HC, ainsi que la biostimilation par apport des nutriments. D'autre part, il ressort que le sol est devenu fertile avec un indice de germination supérieur à 75% dans les 2 andains A et B (**Fig. 16b**). Grâce à l'ajout de l'azote, du phosphore et l'arrosage avec la sortie du lit bactérien on observe une différence très remarquable pour l'IG des terres traitées dans l'andain B par rapport à l'andain A.

En effet, la pollution des sols par les hydrocarbures a pour conséquence un déficit en azote et en phosphore, ce qui peut limiter la biodégradation des hydrocarbures. Pour tout traitement biologique, un enrichissement des terres usagées avec ces éléments sera donc nécessaire. Ce procédé optimisé (Bioremédiation par bioaugmentation et biostimilation) est actuellement appliqué pour le traitement des quantités des terres polluées qui sont stockées à la SOTULUB.

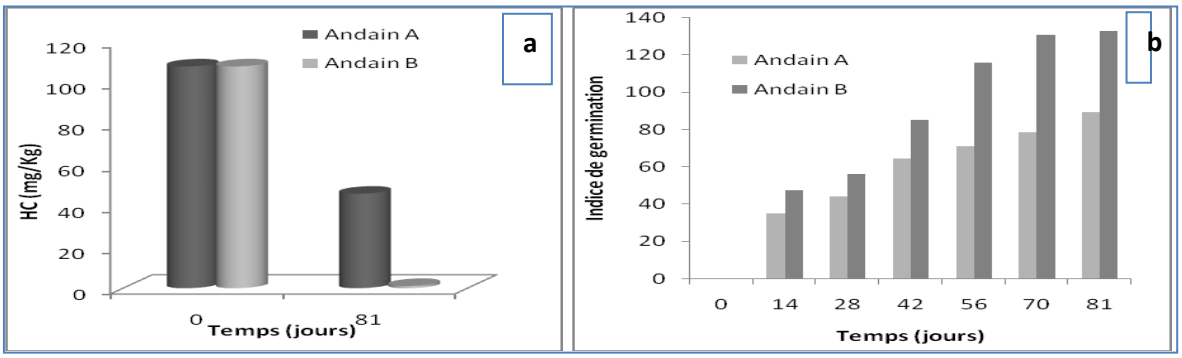


Fig. 16: Evolution du taux d'hydrocarbures (a) et de la phytotoxicité (b) des terres usagées, avant et après traitement par bioremédiation dans les andains A et B.

2.2.2. Evolution de la structure des communautés bactériennes au cours de la bioremédiation des terres usagées par différents procédés :

Dans cette étude, la performance de la biorémediation *in situ* de sols contaminés par des hydrocarbures a été évaluée. Quatre stratégies ont été entamées: 1) microorganismes endogènes et polluants; 2) microorganismes endogènes, polluants et apport de nutriments: (biostimulation); 3) microorganismes endogènes, polluants et l'ajout d'un consortium bactérien hydrocabonoclaste (bioaugmenation);et 4) microorganismes endogènes, polluants, apport de nutriments (biostimulation) et l'ajout d'un consortium bactérien hydrocabonoclaste (bioaugmenation).

L'évolution de la structure des communautés bactériennes au cours de la réhabilitation des sols contaminés par des hydrocarbures a été suivie dans 8 échantillons prélevés (A, B, C, D, E, F, G et H) durant une période de 6 mois de traitement, en utilisant la technique DGGE. L'ADN total des organismes présents dans les échantillons, a été extrait. Puis, la région variable V3 du gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifiée par PCR. Ensuite, les fragments d'ADN obtenus ont été séparés dans un gradient de dénaturation (40 à 70 %). Les profils obtenus par PCR-DGGE des gènes codant pour l'ARNr 16S sont présentés dans la **figure 17**. Les profils DGGE obtenus présentent plusieurs bandes à différents niveaux quelque soit le type de traitement utilisé ce qui prouve l'existence d'une diversité bactérienne importante. Seules les bandes les plus intenses ont été excisées, ré amplifiées et séquencées. L'approche par clonage des bandes DGGE majoritaires obtenues a permis d'apporter des informations sur la position phylogénétique des microorganismes présents. Les séquences des bandes DGGE obtenues ont montré l'affiliation des bactéries présentes dans les phylums *Alpha-Proteobacteria, Gamma-Proteobacteria, Actinobacteria*et*Bacteroidetes.* Les genres les plus présentés sont les genres *Nocardioides, Mycobacterium, Luteimicrobium, Azospirillum, Bradyrhizobium, Sphingomonas, Sphingobium, Salinimicrobium, Proteiniphilium, Rhodococcus, Alcanivorans,* et *Rhizobium*. Les bactéries de ces genres sont connues sous le nom de bactéries hydrocarbonoclastes, capables de dégrader des hydrocarbures aliphatiques et/ou aromatiques. Les résultats obtenus contribueront à une meilleure compréhension des processus en jeu et à l'application potentielle de la bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures.

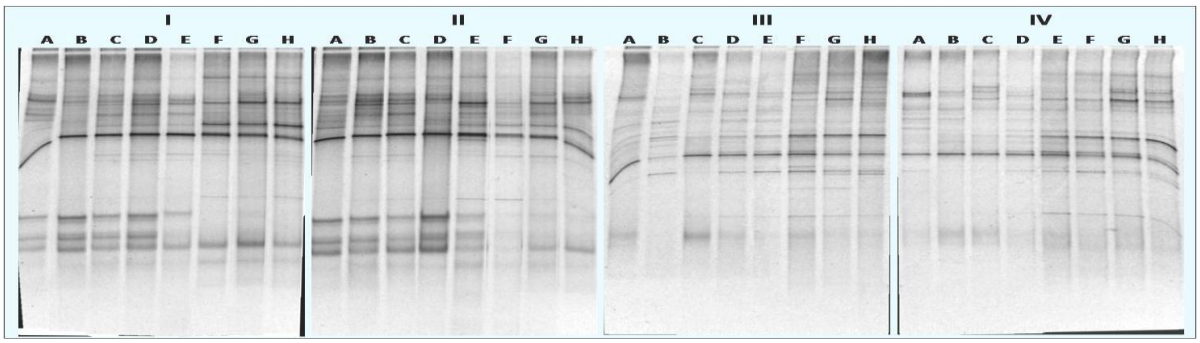


Fig. 17: Séparation par DGGE des fragments d'ADN 16S des bactéries obtenues par PCR à partir des échantillons du sol prélevés au cours du traitement (A, B, C, D, E, F, G et H).
I: Control négatif; II: Bioaugmentation; III: Biostimulation; IV: Biostimulation+Bioaugmenation.

Production Scientifique et Formation diplômante de 2014

Production scientifique de 2014

Publications parues en 2014 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture :

1) Ben Abdallah, M., Karray, F., Mhiri, N., Cayol, JL., Tholozan, JL, Alazard, D., Sayadi, S. **(2014)**. Characterization of *Sporohalobacter salinus* sp. nov., a novel anaerobic, halophilic, fermentative bacterium isolated from a hypersaline lake in Tunisia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, doi: 10.1099/ijs.0.066845-0.

2) Bradai, M., Han, J., ElOmri, A., Funamizu, N., Sayadi, S., Isoda, H. **(2014)**. Cytotoxic effect of linear alkylbenzene sulfonate on human intestinal Caco-2 cells: associated biomarkers for risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12, 2014.

3) Chebbi, A., Mnif, S., Mhiri, N., Jlaiel, L., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2014)**.A moderately thermophilic and mercaptan-degrading *Bacillus licheniformis* strain CAN55 isolated from gas-washing wastewaters of the phosphate industry, Tunisia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 207-213.

4) Cherif, S., Aloui, F., Carrière, F., Sayadi, S. **(2014)**. Lipase Pre-Hydrolysis Enhance Anaerobic Biodigestion of Soap Stock from an Oil Refining Industry. Journal of Oleo Science, 63, 109-114.

5) Chtourou, H., Dahmen, I., Hassairi, I., Abdelkafi, S., Sayadi, S., Dhouib, A. **(2014)**. *Dunaliella* sp. a Wild Algal Strain Isolated from the Sfax-Tunisia Solar Evaporating Salt-Ponds, a High Potential for Biofuel Production Purposes. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 8 (1), 27-34.

6) Dahmen, I., Chtourou, H., Jebali, A., Daassi, D., Karray, F., Hassairi, I., Sayadi, S., Abdelkafi, S., Dhouib, A. **(2014)**. Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (8), 1628-1638.

7) Dammak, I., Neves, MA., Nabetani, H., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. **(2014)**. Effect of pH Condition on the Retention of Oleuropein in Aqueous Solution by Nanofiltration Membrane. *Separation Science and Technology*, 49 (15), 2289-2302.

8) Dammak, I., Neves, MA., Nabetani, H., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. **(2014)**. Transport properties of oleuropein through nanofiltration membranes. *Food and Bioproducts Processing*, 2014.

9) Feki, F., Weissenbacher, N., Assefa, E., Olto, E., Gebremariam, K., Dalecha, T., Shibru, B., Sayadi, S., Langergraber, G. **(2014)**. Rain water harvesting as additional water supply for multi-storey buildings in Arba Minch, Ethiopia. *Desalination and Water Treatment*, 1-8.

10) Ferradji, FZ.,Mnif, S., Badis, A., Rebbani,S., Fodil, D., Eddouaouda, K., Sayadi, S. **(2014)**. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 300-308.

11) Friha, I., Karray, F., Feki, F., Jlaiel, L., Sayadi, S. **(2014)**. Treatment of cosmetic industry wastewater by submerged membrane bioreactor with consideration of microbial community dynamics. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88,125-133.

12) Friha, I., Feki, F., Bouallagui, Z., Sayadi, S. **(2014)**. Cytotoxicity bioremoval achieved by a submerged membrane bioreactor operated at pilot scale for the treatment of surfactant wastewater. *Desalination and Water Treatment*, 1-6.

13) Gouider, M., Feki, M., Sayadi, S. **(2014)**. Treatment of wastewaters from phosphate fertilizer industry. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33 (2), 463-471.

14) Gargouri, B., Karray, F., Mhiri, N., Aloui, F., Sayadi, S. **(2014)**. Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil by bacterial consortium isolated from an industrial wastewater treatment plant. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89 (7), 978-987.

15) Hadrich, F., Arbi, M E., Boukhris, M., Sayadi, S., Cherif, S. **(2014)**. Valorization of the Peel of Pea: *Pisumsativum* by Evaluation of Its Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Oleo Science*, 63 (11), 1177-1183.

16) Hamza, M., Sayadi, S. **(2014)**. Valorisation of olive mill wastewater by enhancement of natural hydroxtyrosol recovery. *International Journal of Food Science and Technology*, doi: 10.1111/ijfs.12704.

17) Mekki, A., Mdhaffar, M., Sayadi, S. **(2014)**. Advance in Mediterranean soil properties following compost amendment. *International Journal of Agricultural policy and Research*, 2 (11): 373- 379.

18) Mnafgui, K., Derbali, A., Sayadi, S., Gharsallah, N., Elfeki, A., Allouche, N. **(2014)**. Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *Journal of Food Science and Technology*, 1-9.

19) Mnif, S., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2014)**. Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 258-264.

20) Mseddi, S., Chakchouk, I., Aloui, F., Sayadi, S., Kallel, M. **(2014)**. Development of a process for the treatment of fish processing saline wastewater. *Desalination and Water Treatment*, 52 (10-12), 2301-2308.

21) Nakai, R., Nishijima, M.,Tazato, N., Handa, Y., Karray, F., Sayadi, S., Isoda, H., Naganuma, T. **(2014)**. *Oligoflexus tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, filamentous bacterium of a novel proteobacterial lineage, and description of *Oligoflexaceae* fam. nov., Oligoflexales ord. nov. And Oligoflexia classis nov.*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (Pt10): 3353-3359.

22) Rigane, G., Bouaziz, M., Sayadi, S., Ben Salem, R. **(2014)**. Effect of Storage on Refined Olive Oil Composition: Stabilization by Addition of Chlorophyll Pigments and Squalene. *Journal of Oleo Science*, 63 (3), 309-309.

23) Samet, I., Han, J., Jlaiel, L., Sayadi, S., Isoda, I. **(2014)**. Olive (*Oleaeuropaea*) Leaf Extract Induces Apoptosis and Monocyte/Macrophage Differentiation in Human Chronic *Myelogenous Leukemia*

K562 Cells: Insight into the Underlying Mechanism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi.org/10.1155/2014/927619.

24) Samet, I., Villareal, MO., Han, J., Sayadi, S., Isoda, H. **(2014)**. Effect of Olive Leaf Components on the Proliferation and Viability of Hematopoietic Stem Cells. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4 (39), 1-7.

25) Skouteris, G., Arnot, TC., Jraou, M., Feki, F., Sayadi, S. **(2014)**. Modeling Energy Consumption in Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment in North Africa. *Water Environment Research*, 86 (3), 232-244.

26) Souilem, S., Kobayashi, I., Neves, MA., Jlaiel, L., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. **(2014)**. Interfacial characteristics and microchannel emulsification of oleuropein-containing triglyceride oil-water systems. *Food Research International*, 62: 467-475.

27) Souilem, S., Kobayashi, I., Neves, MA., Sayadi,S., Ichikawa, S., Nakajima, M. **(2014)**. Preparation of Monodisperse Food-Grade Oleuropein-Loaded W/O/W Emulsions Using Microchannel Emulsification and Evaluation of Their Storage Stability. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (7), 2014-2027.

28) Zaghden, H., Kallel, M., Elleuch, B., Oudot, J., Saliot, A., Sayadi, S. **(2014)**. Evaluation of hydrocarbon pollution in marine sediments of Sfax coastal areas from the Gabes Gulf of Tunisia, Mediterranean sea. Environmental Earth Science, 72, 1073-1082.

29) Zayen, A., Mnif, S., Jlaeïl, L., Bouaziz, M., Sayadi, S. **(2014)**. Phthalates accumulation inside an anaerobic membrane bioreactor for landfill leachate treatment. *Desalination and Water Treatment*, 1-8.

Brevets d'inventions déposés (INNORPI et autres organismes internationaux) en 2014 :

1) Mitsutoshi Nakajima, Marcos Neves, Hiroko Isoda, Ilyes Dammak, Sami Sayadi. Method for isolating polyphenols from olive mill water. **U.S. Patent N°**US 20150045449A1.

2) Hiroko Isoda, Junkuy Han, Sami Sayadi, Mohamed Bradai. Compositions and methods for linear alkylbenzene sulfonate (las) risk assessment.**U.S. Patent App.** 13/685, 354, 2014.

Formation diplômante de 2014

- ***Liste des thèses de doctorat es-sciences soutenues en 2014 :***

1) **Manel Hamza Karray :** Bioconversion enzymatique des composés phénoliques des effluents issus de l'extraction d'huile d'olive: une voie prometteuse de valorisation par la production de l'hydroxytyrosol naturel. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 12/03/2014.

- ***Liste des mastères de recherche soutenus en 2014 :***

1) **Meriam Cheffi :** Isolement et caractérisation de deux bactéries marines hydrocarbonoclastes et étude des capacités biodégradatives. Mastère de recherche en Sciences de la vie, spécialité Biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenu le 27/11/2014.

2) **Raouia Boujelben :** Essais de traitement fongique des effluents de tannerie: Effet sur la pollution organique et minérale. Mastère de recherche en Sciences de la vie, spécialité Biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenu le 28/11/2014.

Organisations des manifestations scientifiques en 2014

1) Les Deuxièmes journées internationales sur le thème: Phototrophes aquatiques et Biotechnologie, Taxonomie, Extrêmophiles, Photosynthèse, Bioprocédés, Biocapteurs, Bioremediation. Industrialisation et Essaimage. Mahdia, 30 Mars- 1 Avril 2014.
2) International Conference in Integrated Management of Environment (ICIME 2014). Hammamet, 25-28 Septembre 2014.
3) Premières Journées Nationales de Dynamisation de la Recherche Scientifique de l'ANPR, 15-16 Décembre 2014, Hammamet- Tunisie.

Conventions/contrats signés et prestations de service réalisées en 2014 avec des partenaires socio-économiques nationaux

1) **SEDD** : Convention d'assistance et analyses
2) **Société d'Etudes et d'aménagement des côtes nord de la ville de Sfax** (TAPARURA) : Analyses physico-chimiques des eaux de mer et des sédiments marins.
3) **SOTULUB** : Renouvellement pour une année la convention d'assistance de la SOTULUB aux différents projets environnementaux.
4) **Viatech** : Analyses physico-chimiques
5) **Dar Essaydali** : Diagnostic du fonctionnement de la station d'épuration de la société.
6) **Natubio** : Analyses physico-chimiques et microbiologiques des produits cosmétiques.
7) **FONTEC** : Analyses physico-chimiques.
8) **TPS** : Analyses physico-chimiques
9) **PHARMACARE** : Analyses des produits cosmétiques (IR)
10) **SIMED** : Contrôle des produits pharmaceutiques (métaux, spectres IR)

Conventions signées en 2014 dans le cadre des projets de coopération scientifique bilatérale

1) **Laboratoire Mixte International :** LMI COSY-MED. Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranées (2014-2019). *Coordinateurs:* Pr. Sami Sayadi et Dr. Olivier Pringault.

Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes

(L PAP)

مخبر حماية النباتات وتحسينها

Responsable : Pr. Slim Tounsi

Liste actualisée des membres du laboratoire de recherche (LPAP)

- Corps A :

Grade	Nom et prénom	N° C.I.N	Etablissement	Université
Professeurs	*Tounsi Slim*	01346476	CBS	Sfax
	Moez Hanin	05241256	ISBS	Sfax
Maitres de conférences	Brini Faïçal	05307210	CBS	Sfax
	Rouis Souad	01279024	CBS	Sfax
	Khoudi Habib	03378443	CBS	Sfax
	Kais Jamoussi	05266450	CBS	Sfax
	Lobna Abdelkéfi	05321692	ISBS	Sfax
	Mohamed Trigui	05312682	IPEIS	Sfax

- Corps B :

Grade	Nom et prénom	N° C.I.N	Etablissement	Université
Maitres assistants	Yakoubi-Bouchrit Ines	04768559	CBS	Sfax
	Saïbi Walid	06012746	CBS	Sfax
	Choura Mouna	05393525	CBS	Sfax
	Hichem Azzouz	05333041	CBS	Sfax
	Raida Zribi	05321892	CBS	Sfax
	Olfa Frikha	05349976	CBS	Sfax
	Wafa Jallouli	05362770	CBS	Sfax
	Rania Ben Saad	08151697	CBS	Sfax
	Nejib Saïdi	06033428	CBS	Sfax
	Fatma Driss Zouari	05358619	CBS	Sfax
	Karama Bouassida	05295422	ISBS	Sfax
	Ebel Chantal	08895840	ISBS	Sfax
Assistants	Hatem Boubakri	04554776	CBS	Sfax

- **Doctorants (préparant une thèse de doctorat es-sciences):**

Nom et prénom	N°C.I.N	Etablissement-Université	Année de la première inscription	Nom et prénom de l'encadreur
Ghorbel Mouna	08766377	FSS	Dec 2010	Dr. Moez Hanin
Tounsi Sana	08787560	FSS	Jan 2011	Dr. Faiçal Brini
Drira Marwa	08800557	FSS	Jan 2012	Dr. Faïçal Brini
Jmal Rania	08789625	FSS	Jan 2013	Dr. H. Khoudi
Belgaroui Nebras	08788110	FSS	Jan 2013	Dr. Moez Hanin
Hamdi Karama	08803908	FSS	Jan 2013	Dr. Faiçal Brini
Héla Safi	08843250	ENIS	Jan 2013	Dr. Faiçal Brini
Mahjoubi Habib	08369755	FSS	Décem 2013	Pr. Moez
Elleuch Jihen	08760985	FSS	Oct 2009	Pr. S Jaoua
Zouari Imen	08783791	ENIS	2011	Pr. Slim Tounsi
Mhalla Dhekra	08681273	FSS	2011	Dr M. Trigui
Kahla Yosra	08842101	FSS	Jan 2013	Pr. Slim Tounsi
Kharrat Marwa	08842239	ENIS	Jan 2013	Pr. Slim Tounsi
Boukadi Hanen	08198279	FSS	Dec 2010	Pr. Slim Tounsi
Zalila Imen	08765568	FSS	Dec 2010	Pr. Slim Tounsi
Ben Abdallah Dorra	08805851	FSS	Jan 2013	Pr. Slim Tounsi
Abdelmalek Nouha	08825900	FSS	Jan 2013	Dr. Souad Rouis
Fatma Masmoudi	08803451	FSS	Jan 2013	Dr M. Trigui
Dammak Ines	08841976	FSS	Jan 2013	Pr. Slim Tounsi
Hanen Dhouib	08788199	FSS	Dec 2013	Pr. Slim Tounsi
Samar Makni	08860502	FSS	Dec 2013	Pr Slim Tounsi

- **Cadres ayant un grade équivalent ou homologue au grade d'assistant de l'enseignement supérieur**

Nom et prénom	N° C.I.N	Qualité	Etablissement
Ayadi Malika	01321871	Ingénieur	CBS
Ben Abdennour Abedmajid	04871199	Ingénieur	CBS
Ben Abdallah Sami	08352899	Ingénieur	CBS

- **Cadres techniques et Ouvriers**

Nom et prénom	N° C.I.N	Qualité	Etablissement
Azaza Jalel		Technicien Supérieur	CBS
Boughanmi Chadya		Technicien	CBS
Brahmi Mohamed		Agent de Laboratoire	CBS

- **Etudiants en mastère de recherche**

Nom et prénom	N°C.I.N	Etablissement-Université	Année de la première inscription	Nom et prénom de l'encadreur
Asma Ben Feki	08875249	FSS	2013	Moez Hanin
Madina Asma Khemakhem		FSS	2013	Faiçal Brini
Mariem Bradaii	08881292	FSS	2013	Chantal Ebel
Imen Bouchaala	08882320	FSS	2013	Kais Jamoussi
Imen Atitallah	08875903	FSS	2013	Wafa Jallouli
Rihab Jbir	08881930	FSS	2013	Wafa Jallouli
Nawel Trabelsi	08876800	FSS	2013	Raida Zribi

INTRODUCTION & OBJECTIFS

Le laboratoire de protection et d'amélioration des plantes développe deux programmes de recherche intitulés :

1- Amélioration et transformation des plantes
2- Biopesticides

L'objectif opérationnel du programme amélioration et transformation des plantes est de créer du matériel végétal mieux adapté aux contraintes de l'environnement (stress hydrique et salin, stress biotiques). La culture des céréales en Tunisie est généralement soumises à des contraintes hydriques dues essentiellement à une sécheresse fréquente à la quelle vient s'ajouter des problèmes de salinisation des sols. Cette situation est souvent aggravée par l'apparition de maladies comme la rouille, la septoriose, le fusarium,.. La tolérance des plantes aux stress biotiques et abiotiques est sujette à des variations alléliques naturelles gouvernées par plusieurs gènes. L'identification et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance aux stress biotiques et abiotiques, constituent une étape fondamentale dans l'amélioration de la tolérance des plantes cultivées. La stratégie adoptée repose sur une forte interaction entre isolement et caractérisation de gènes impliqués dans la tolérance au stress abiotiques et production de variétés de blé plus tolérantes à ces contraintes de l'environnement. Elle s'appuie sur des partenariats importants et durables. Dans ce programme il y a deux projets de recherche qui sont envisagés et concernent :

Projet 1 : Génomique fonctionnelle de la tolérance aux stress abiotiques chez les céréales.

Projet 2 : Signalisation et régulation de l'expression des gènes impliqués dans la tolérance aux stress.

Projet 3. Exploitation du potentiel génétique d'une graminée halophyte (*A. littoralis*) pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez les céréales.

Le programme Biopesticides vise à mettre au point des différents bioinsecticides, biofongicides et antibiotiques d'origines microbienne, végétale et algale. Ces biopesticides sont sains, originaux et pourraient être exploités dans les domaines de l'agriculture, de l'environnement et de la santé publique. Trois projets font partie de ce programme et se résument comme suit :

Projet 1 : Etude et Production de bioinsecticides d'origine microbienne et végétale

Projet 2 : Les biofongicides d'origines microbienne et végétale

Projet 3 : Les Bactéricides d'origines microbienne et végétale

Programme 1 : Amélioration et transformation des plantes

Responsable : Pr. Faiçal BRINI

1- OBJECTIFS ET BUTS :

L'objectif principal du programme amélioration et transformation des plantes serait le développement de céréales plus tolérantes aux contraintes de l'environnement (sécheresse et salinité), capables de maintenir une production rentable dans des zones semi arides à arides inexploitées à l'heure actuelle.

Le développement de la filière des céréales passe obligatoirement par l'adoption de paquets technologiques pour la gestion intégrée des cultures (amélioration variétale pour l'obtention de variétés adaptées aux besoins des utilisateurs- agriculteurs et transformateurs, tout en tenant compte en plus des aspects relatifs à la résistance aux maladies, la sécheresse et la salinité ou encore aux rendements mais également de la qualité des céréales à la transformation). L'adoption des paquets technologiques permettra d'améliorer les rendements et la qualité des produits agricoles tout en tenant compte de l'environnement. Pour atteindre ces objectifs, différents projets de recherche ont été menés en parallèle et concernent l'isolement de gènes candidats impliqués dans la tolérance aux stress à partir du blé et leur validation fonctionnelle dans des plantes transgéniques modèles (Arabidopsis, tabac).

2- RESUME DES RESULTATS OBTENUS:

Projet 1 : Génomique fonctionnelle de la tolérance aux stress abiotiques chez les céréales

1.1. Les transporteurs de type HKT :

Pour comprendre les mécanismes de tolérance au stress salin chez le blé, nous nous sommes intéressés à étudier les transporteurs de la famille des HKTs (High Affinity Potassium Transporter) qui compte parmi les principaux systèmes de transport impliqués dans la tolérance des plantes au sel chez les céréales. Les données bibliographiques disponibles sur cette famille suggèrent l'existence d'une grande diversité concernant les propriétés fonctionnelles de ces transporteurs, leur localisation tissulaire et la régulation de l'expression. Cette diversité complique l'analyse de leurs fonctions *in planta*, qui sont encore peu comprises malgré la grande importance de ces systèmes dans la réponse au stress salin. Chez le blé en particulier, la polyploïdie et le grand nombre de transporteurs HKT constituent un vrai obstacle entravant la compréhension des fonctions de ces systèmes *in planta*.

Isolement de deux nouveaux isoformes HKT1;4 de blé dur

A partir d'une banque génomique de blé tendre (clones Bac séquencés du chromosome 2 ; Accès privé-Montpellier), nous avons fait des alignements de séquences avec les deux isoformes HKT1,4 déjà identifiées par Ben Amar et al. (2014). Ces alignements nous ont permis de définir des amorces et ceci dans le but d'amplifier un ou plusieurs ADNc complet codant pour des nouveaux isoformes HKT1;4 de blé dur.

Des expériences de RT-PCR ont été menées sur de l'ARN extrait de différents tissus (racines ; gaines ; feuilles) des plantules des deux variétés de blé dur Mahmoudi et Om Rabia âgées de 10 jours contrôles ou traitées par 100 mM NaCl pendant 48 heures. Nos résultats de séquençage et d'alignement de séquences confirment bien que les deux TdHKT1,4 isolées sont de nouveaux isoformes et que le TdHKT2 ;2 est le premier gène de la famille 2 isolé chez le blé dur.

L'analyse phylogénétiques entre TdHKT1;4-2BL5 du blé dur et les autres transporteurs déjà identifiés chez le blé et le riz a montré une forte homologie entre TdHKT1 ;4-2BL5 et TmHKT1;4-A2 formant un sous-groupe (**Fig. 1**). Deux autres sous-groupes, l'un comprend TdHKT1;4-1 et TmHKT1;4-A1 et l'autre forme un sous-groupe qui se distingue du reste représenté par TdHKT1;4-2 et celui de OsHKT1;4 (Fig. 1).

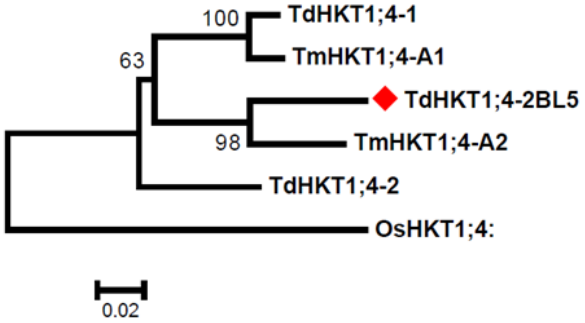


Figure 1 : Arbre phylogénétique des différents transporteurs HKT1;4 du riz et du blé. L'arbre phylogénétique a été construit par le logiciel MEGA6 avec 1000 bootstraps répliqués.

L'analyse phylogénétique des transporteurs HKT2 montre deux familles de gènes. La première comprend OsHKT2;1 et OsHKT2;2 et la deuxième famille comprend deux groupes. Le premier est celui de HvHKT2;2 et HvHKT2;1 et l'autre comprend TdHKT2;1 et TaHKT2;1 (Fig. 2).

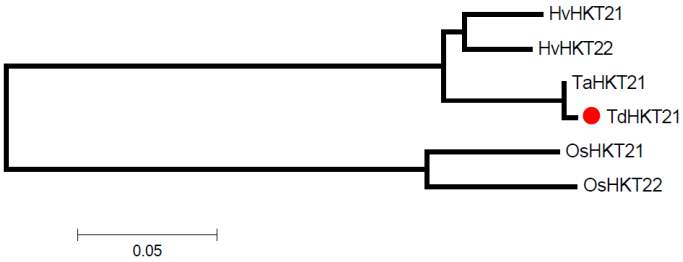


Figure 2: Arbre phylogénétique des différents transporteurs HKT2 ;1 et HKT2 ;2 du blé, du riz et de l'orge. L'arbre phylogénétique a été construit par le logiciel MEGA6 avec 1000 bootstraps répliqués.

Etude du niveau d'expression des HKT isolés chez les deux variétés de blé dur soumises à un stress salin

Une étude du patron d'expression des différents HKT isolés chez les deux variétés de blé dur OR et Mh au niveau des racines, des gaines et des feuilles de jeunes plantules de blé soumises à 100 mM NaCl pendant 48 h a été réalisée. Les données préliminaires indique que le niveau d'expression des gènes *HKT* est variable selon l'intensité du stress salin, l'organe étudiée (feuilles, gaines, ou racines), et enfin selon le niveau de tolérance exprimé par les deux variétés étudiées (OR) et (Mh). Ces résultats révèlent d'une façon générale l'importance des gènes *HKTs* dans le piégeage du sodium au niveau des gaines et de limiter ainsi le transport vers les parties aériennes, son accumulation dans les feuilles où il devient toxique pour la plante (**Fig. 3, 4 et 5**).

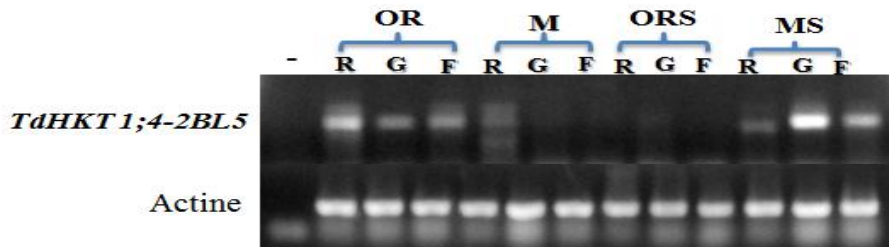


Figure 3 : Analyse par RT-PCR de l'expression de TdHKT1,4-2BL5 en condition contrôle et de stress salin 100 mM pendant 48h. Racines (R), des gaines (G) et des feuilles (F). (-) contrôle négatif ; Le gène constitutif de l'actine est utilisé comme contrôle interne, obtenu en amplifiant un fragment de 300 pb avec les amorces Act_F et Act_R.

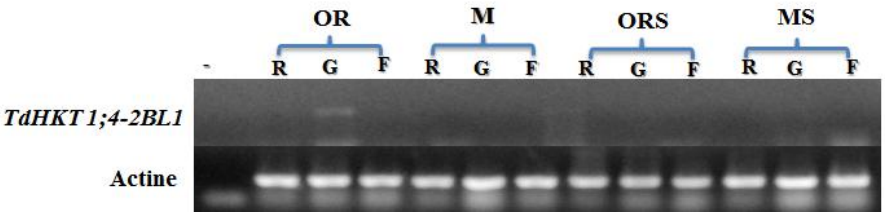


Figure 4: Analyse par RT-PCR de l'expression de TdHKT1,4-2BL1 en condition contrôle et de stress salin 100 mM pendant 48hRacines (R) , des gaines (G) et des feuilles (F). (-) contrôle négatif ; Le gène constitutif de l'actine est utilisé comme contrôle interne, obtenu en amplifiant un fragment de 300 pb avec les amorces Act_F et Act_R.

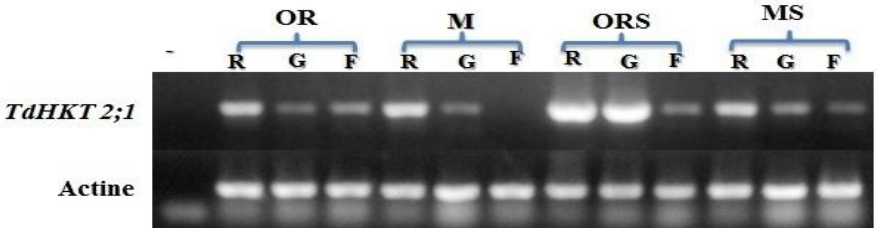


Figure 5: Analyse par RT-PCR de l'expression de TdHKT2;1 en condition contrôle et de stress salin 100 mM pendant 48h .Variété Om Rabia (OR), Variété Mahmoudi (M), Racines (R), Gaines (G), Feuilles (F). (-) contrôle négatif. Le gène constitutif de l'actine est utilisé comme contrôle interne, obtenu en amplifiant un fragment de 300 pb avec les amorces Act_F et Act_R.

En conclusion, l'étude de la régulation de l'expression des différents gènes *HKT* en fonction d'un stress salin chez le blé est d'une importance capitale dans la compréhension du mécanisme de la tolérance à ce stress.

1.2. Rôle de la protéine DHN-5 du blé dans l'amélioration de la tolérance aux stress oxydatif

Il est communément admis qu'à l'instar des autres contraintes abiotiques, la salinité soumet les plantes à un stress oxydant. Les déhydrines sont impliqués dans l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez les plantes. Elles sont actives à l'état désordonné et elles agissent dans la séquestration

d'ions (Roberts et al., 1993), la rétention de l'eau (McCubbin et al., 1985), la protection contre l'inactivation des enzymes suite à un traitement par la chaleur (Brini et al., 2010) et l'agrégation de diverses protéines (Kovacs et al., 2008). Nous avons montré que les plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* exprimant la déhydrine (*DHN-5*) (les lignées D_2 et D_4) sont tolérantes au stress oxydatif causé par H_2O_2. En plus, ces plantes accumulent significativement l'acide ascorbique. Vue l'importance de la déhydrine DHN-5 dans la réponse au stress oxydatif, nous avons jugé intéressant d'étudier le mécanisme de réponse au stress oxydatif causé par le stress salin ou hydrique, qui se traduit par l'étude tous d'abord du système enzymatique (CAT, SOD, POD) et non enzymatique (AsA et GSH). En plus de ces travaux, nous nous sommes intéressé de quantifier quelques indicateurs de stress comme le H_2O_2, la peroxydation des lipides qui génère les MDA et les superoxydes.

- **Effet de stress sur la peroxydation des lipides membranaires chez les plantes transgéniques DHN-5**

Le malondialdéhyde (MDA) est présent naturellement dans les tissus soumis à un stress oxydatif. C'est un produit de la dégradation oxydative des lipides et des acides gras insaturés. En absence de stress abiotique (salin et hydrique), la peroxydation des lipides des plantes testées est presque similaire. Le stress salin et hydrique engendre une accumulation significative du MDA au niveau des feuilles des plantes sauvages (Wt), qui est presque deux fois plus par rapport au témoin. Au niveau des racines, le taux de MDA augmente plus en présence de mannitol qu'en présence de NaCl. Concernant les plantes D_2 et D_4 stressées par le sel ou par le mannitol, la peroxydation des lipides est moins intense au niveau des feuilles (**Fig. 6**). Ces observations nous ont permit de déduire que le stress oxydatif est plus accentué dans les feuilles que dans les parties aériennes des plantes traitées par le NaCl et par le Mannitol. Donc, ces premiers tests nous ont permis de suggérer que les plantes transgéniques sont plus tolérantes au stress salin et hydrique, grâce à un mécanisme de réponse au stress oxydatif par rapport aux plantes non transformées (Wt).

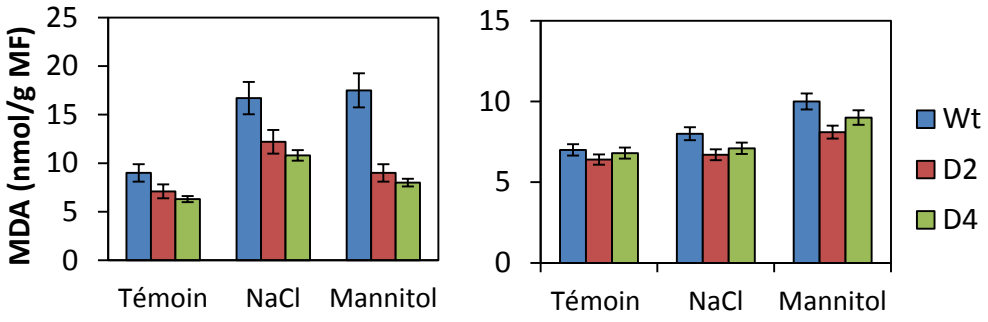


Figure 6 : Variation de la teneur du MDA au niveau des feuilles (A) et des racines (B) des plantes d'*Arabidopsis* sauvages (Wt) et transgéniques (D_2 et D_4) en présence de (100 mM NaCl) ou de (100 mM Mannitol).

- **Accumulation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 chez les plantes transgéniques DHN-5**

La détermination de la teneur en H_2O_2 permet d'évaluer la capacité des plantes à contrôler l'accumulation des espèces oxygénées réactives en conditions de stress oxydatif.

Au niveau des feuilles et des racines, la teneur en H_2O_2 est pratiquement la même chez les plantes d'*Arabidopsis* sauvages et transgéniques cultivées dans les conditions normales. Le peroxyde d'hydrogène est fortement accumulé au niveau des feuilles et des racines des plantes sauvages soumises aux stress salin et hydrique. Par contre, l'application de stress n'induit pas cette augmentation dans les différentes parties des plantes transgéniques (Fig. 7). Donc, il semble que ces plantes possèdent un mécanisme de réponse vis-à-vis à l'accumulation de ces composés toxiques.

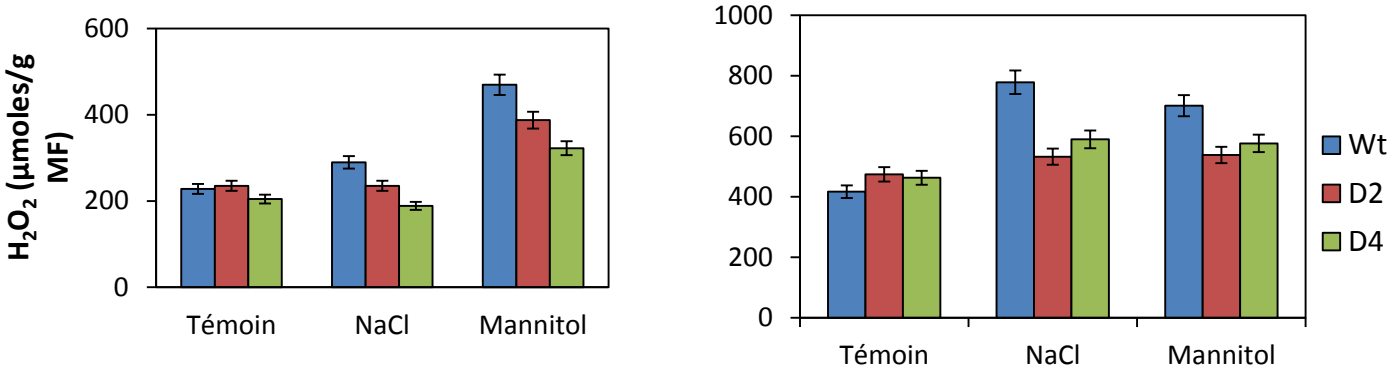


Figure 7 : Variation de la teneur en H_2O_2 au niveau des feuilles (A) et des racines (B) des plantes Arabidopsis sauvages (Wt) et transgéniques (D_2 et D_4) en présence de (100mM NaCl) et (100 mM Mannitol).

- **Détection de superoxyde O_2^- chez les plantes transgéniques DHN-5**

Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode de coloration par le NBT qui est basé sur la réduction de NBT en formazan coloré en bleu, après sa réaction avec les superoxydes.

En absence de stress, la coloration en bleu est observée dans les différentes parties des plantes testées, ce qui prouve que les molécules de superoxyde sont présentes même en conditions normales. Donc, la réduction incomplète de l'oxygène qui peut donner le superoxyde comme produit est capable de se produire naturellement. L'addition de NaCl ou de mannitol entraine une production intense de superoxyde, qui se traduit par une coloration bleue foncée chez les plantes Wt. Contrairement à ces plantes, les plantes transgéniques D_2 et D_4 stressées sont faiblement colorées au niveau des feuilles et des racines (**Fig. 8).**

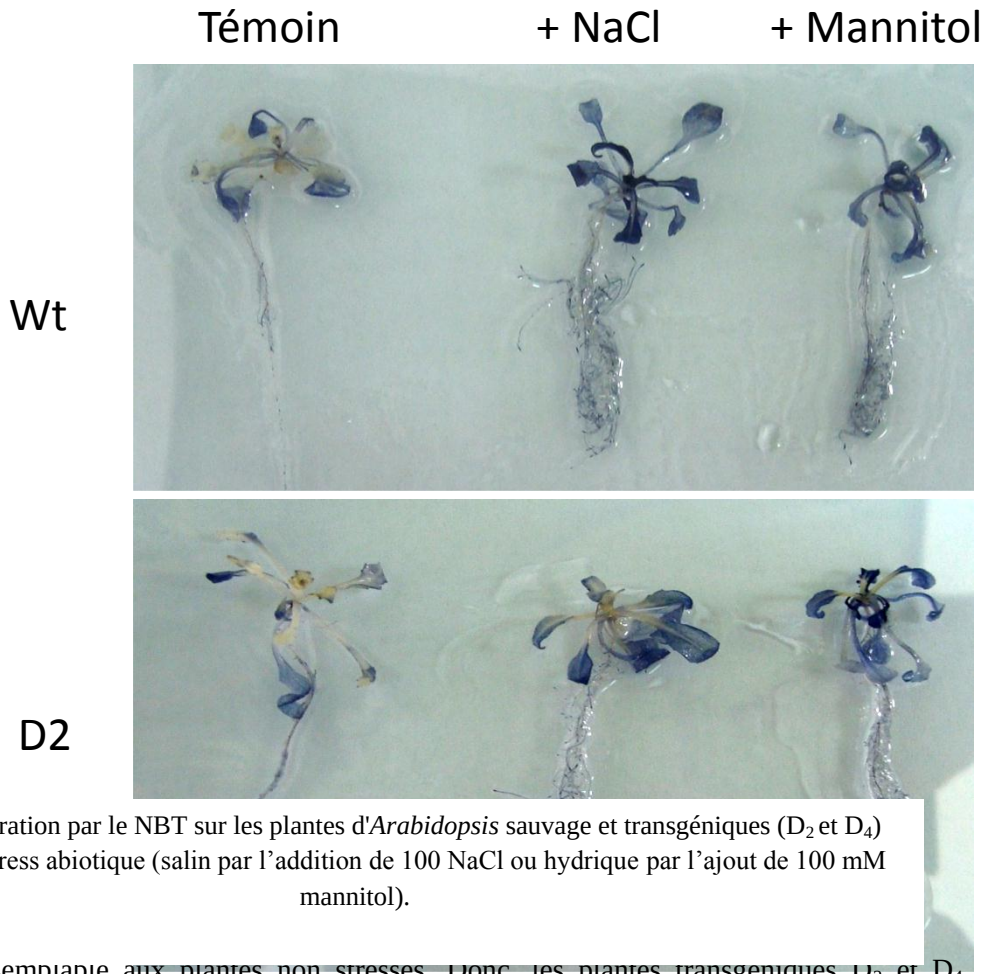
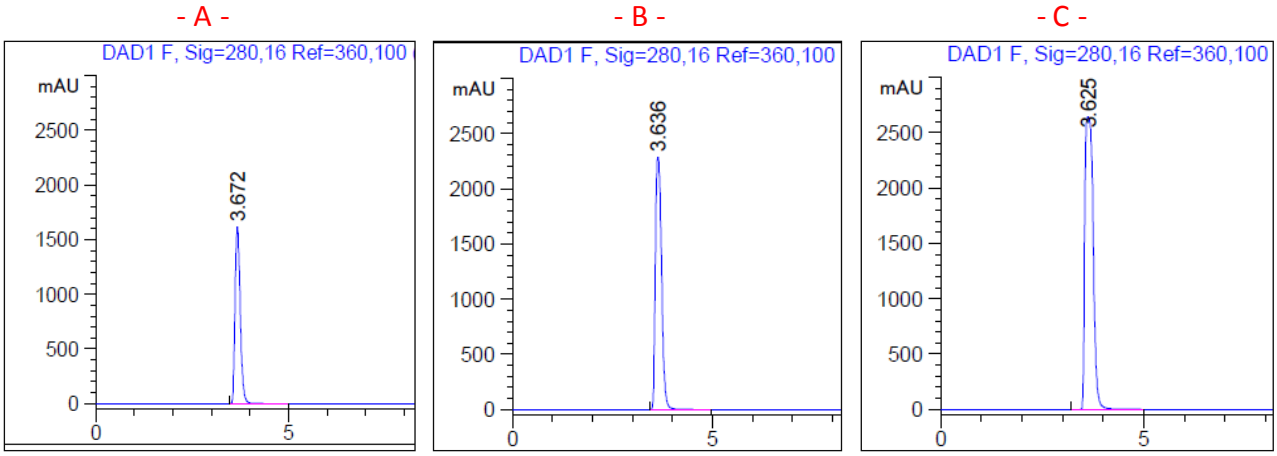


Figure 8 : Coloration par le NBT sur les plantes d'*Arabidopsis* sauvage et transgéniques (D_2 et D_4) soumises à un stress abiotique (salin par l'addition de 100 NaCl ou hydrique par l'ajout de 100 mM mannitol).

Cette coloration est semblable aux plantes non stresses. Donc, les plantes transgéniques D_2 et D_4 stressées accumulent moins de superoxyde que les plantes Wt, ce qui se manifeste par l'implication d'un mécanisme de tolérance au stress salin et hydrique.

- **Dosage de L'acide ascorbique (AsA)**

L'acide ascorbique est l'un des antioxydants les plus étudiés et les plus puissant (Noctor et Foyer 1998 ; Arrigoni et de Tullio., 2000 ; Smirnoff., 2000). L'acide ascorbique peut éliminer directement l'ion superoxyde, les radicaux OH et O_2^- et réduire le H_2O_2 en eau via la réaction de l'ascorbate peroxydase (Noctor et Foyer., 1998). Il a été démontré que le taux de l'AsA diminue suite à l'application de stress salin (Sairam et al., 2005 ; Athar et al., 2008). Dans cette étude, nous avons utilisé la technique de HPLC. Des solutions d'AsA de concentrations connues (0.1, 0.25 et 0.5 mg/ml) ont été utilisées comme standards. Les résultats de HPLC sont présentés sous forme de pic ayant une hauteur et surface bien déterminées. A titre d'exemple, nous avons présenté les trois pics des trois solutions standards dans la **Fig. 9**.



Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.672	1	BB	1.97100e4	2051.66235	56.5426
2	3.672	2	BB	1.51487e4	1613.83459	43.4574

Figure 9 : Présentation des trois pics obtenus par HPLC correspondant aux solutions standards d'acide ascorbique, qui sont 0.1 mg/ml (A), 0.25 mg/ml (B), 0.5 mg/ml (C).

Le stress salin et hydrique induit une diminution de la teneur en AsA au niveau des parties aériennes. Cette baisse est beaucoup plus prononcée chez les plantes sauvages Wt traitées par le NaCl et le mannitol, qui est presque de 75% par rapport au plantes non stressées. Alors que cette chute est moins prononcée chez les plantes transgéniques D2 et D4 soumises à un stress salin ou hydrique (Figure 9).

L'ensemble de ces résultats plaide en faveur le rôle des déhydrines dans la réduction du stress oxydatif, par réduction de composés oxygénés réactives comme H_2O_2 et O_2^- et l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes comme SOD et POD, et par la suite dans la réponse au stress salin et hydrique.

1.3. Les protéines de transfert de lipides

La réponse aux stress biotiques et abiotiques chez les plantes est un phénomène très complexe, dont la cascade de réactions fait intervenir un grand nombre d'enzymes et de composés, qu'ils s'agissent de protéines ou de molécules de signalisation. Parmi eux, les protéines de transfert de lipides (LTP, lipid transfer protein) jouent un rôle primordial. Ces protéines sont étroitement associées à de nombreux processus de développement des organes végétaux et de réponse aux stress biotiques (pathogènes microbiens, blessures) et abiotiques (chocs thermiques, salinité et ABA). L'implication des LTPs dans la réponse aux pathogènes a été déjà rapportée mais une éventuelle contribution dans les mécanismes de tolérance aux stress abiotiques tels que les stress hydriques reste à démontrer.

Au cours de l'année 2014, nous avons entamé la production et la purification de la protéine TdLTP4 en utilisant le vecteur d'expression pGEX4T-1 chez E. coli. Nous avons entamé l'expression

de cette protéine chez deux souches d'*E. coli* différentes (Shuffle T7 et Origami DE3). L'optimisation des conditions de production de la protéine TdLTP4 (Temps, température d'induction) dans un petit volume (100 ml), a montré que la protéine recombinante est bien produite surtout dans la phase insoluble chez les deux souches (**Fig. 10**).

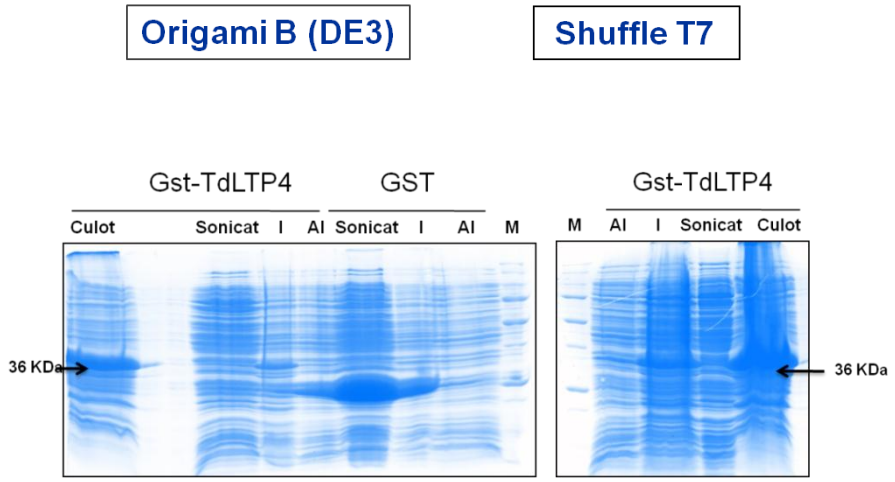


Figure 10 : Profils de séparation de la protéine recombinante par SDS-Page chez les deux souches *d'E. coli.*

Ensuite, une grande culture de 2 litres a été lancée dans un bioréacteur et le produit de sonication ainsi obtenu a été purifié par passage sur une colonne d'affinité Gluthation-S-Transférase moyennant l'appareil AKTA. Les analyses de cette dernière ont montré la présence d'un petit pic qui correspond à une faible quantité de protéine produite au niveau du surnageant ce qui confirme encore que notre protéine est majoritairement produite dans la phase insoluble (culot), ce qui rend la purification difficile (Fig. 10).

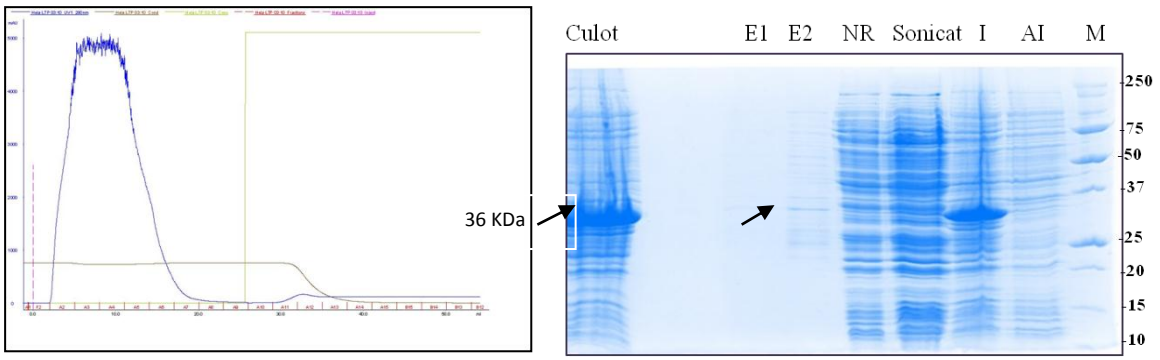


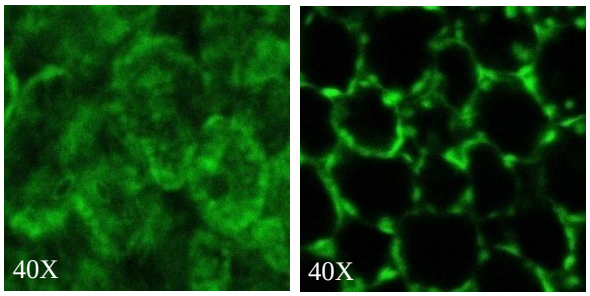
Figure 10 : Séparation de la protéine TdLTP4 par SDS-Page (produite dans 2L de culture).

D'ici deux hypothèses qui se posent : c'est que soit la protéine TdLTP4 se produit sous forme de corps d'inclusion, soit elle est membranaire. Afin de confirmer une telle hypothèse, des essais de solubilisation de la protéine en utilisant des solutions dénaturantes contenant, l'urée 8M, la guanidine (6 M) et le DTT ont été faites. Les résultats obtenus ont confirmé qu'il ne s'agit pas d'un problème de corps d'inclusion, mais en contre partie il s'agit d'une protéine membranaire. Cette dernière reste

toujours accrochée à la membrane des bactéries après séparation des deux phases soluble et insoluble même dans des conditions dénaturantes ce qui bloque sa purification.

En conclusion, nous avons montré que le système d'expressionpGEX4T1 n'est pas efficace pour purifier la protéine TdLTP4 et il faudra penser à changer de système de tell manière à guider la protéine vers le surnagent (phase soluble) comme ceux du pPIC chez la levure (*Pichia pastoris*) ce qui pourrait rendre sa purification plus facile.

Dans la partie caractérisation des plantes transgéniques d'Arabidopsis thaliana surexprimant TdLTP4, nous avons étudié la localisation cellulaire de cette protéine chez ces plantes et nous avons montré qu'elle est membranaire **(Fig. 11**). Ce qui est en fafeur du role de cette protéine dans la protection des plantes contre les infections pathogènes.



GFP TdLTP4::GFP

Figure 11 : Localisation cellulaire de la protéine TdLTP4 de blé chez les tissus des plantes transgéniques d'Arabidopsis thaliana.

Des études antérieures ont révélé l'implication des LTP dans les mécanismes de défense lors des attaques par des phytopathogènes. Ceci suggère que les LTPs pourraient être impliquées dans l'activation de gènes de réponse aux pathogènes et l'altération de la voie de signalisation de l'AJ. Ces résultats suggèrent que TdLTP4 pourrait être impliquée dans ce système de défence. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons mené des études visant à tester la réponse des plantes transgénique d'*Arabidopis* surexprimant TdLTP4, à l'AJ (hormone impliquée dans la réponse aux stress biotiques). Nos résultats ont révélé que l'application exogène de l'AJ montre que ces lignées transgéniques sont plus résistantes à ces traitements que les lignées sauvages (**Fig. 12**).

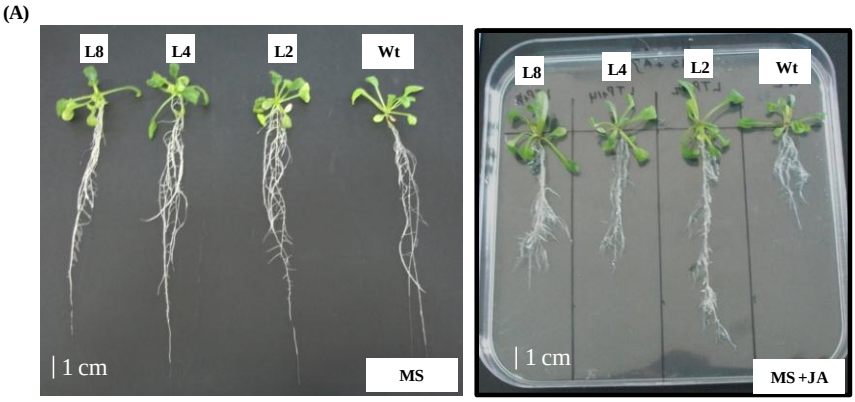


Figure 12 : Effet de l'acide jasmonique sur le croissance des plantes transgéniques d'Arabidopsis thaliana surexprimant TdLTP4 de blé.

1.3. Recherche de QTLs impliquées dans la tolérance aux stress abiotiques chez le blé dur

Le blé dur est une des cultures céréalières les plus importantes en Tunisie. Pour faire face aux aléas climatiques, la Tunisie (comme la majorité des pays méditerranéens) et à travers des programmes d'amélioration doit améliorer les potentialités génétiques de ses variétés cultivées et ceci en introduisant des allèles favorables permettant l'adaptation aux nouvelles conditions climatiques ; Le « germoplasme » tunisien a été caractérisé du point de vue morphologique, physiologique et agronomique. Cependant, les données sur la diversité génétique sont rares. L'évaluation de cette diversité et des potentialités génétiques devient aujourd'hui une nécessité nationale pour son ultérieure exploitation comme réservoir de gènes ou d'allèles favorables.

Les marqueurs moléculaires de type SSRs, ou SNPs servent aujourd'hui de base pour les nombreuses recherches fondamentales sur la structure, le fonctionnement et l'évolution du génome de blé mais aussi appliquées permettant l'exploitation des ressources génétiques, l'identification des régions du génome portant des gènes d'intérêt et l'amélioration des variétés basées sur l'assemblage des allèles favorables (MAS : Sélection assistée par les marqueurs).

Durant ces dernières années des marqueurs moléculaires du type SSRs ont été développés chez le blé dur (*Triticum Drum*) et ont montré leur efficacité pour des études aussi bien fondamentales qu'appliquées. Ainsi notre laboratoire s'est fixé, depuis deux ans, comme objectif le développement de l'axe « marqueurs moléculaires » pour l'utilisation dans la sélection variétale et aussi l'identification des nouveaux gènes candidats pour la tolérance aux stress abiotiques.

- Formation d'une petite collection de blé dur.

Le premier problème que nous avons rencontré pour développer cet axe de recherche est la disponibilité du matériel végétal. Malgré les difficultés rencontrées, nous avons pu avoir 80 variétés de blé dur (majorité landraces) dont 50 sont tunisiennes et 30 variétés algériennes. Cette collection sera élargie durant les années à venir. La multiplication de ces différentes variétés a été faite au niveau de la station expérimentale de Béja grâce à une convention établie entre cette dernière et notre laboratoire. Au cours de cette année plusieurs déplacements ont été effectués pour suivi et apport du matériel végétal.

- Etude phénotypiques

La convention faite avec la station de Béja a permis la caractérisation phénotypique de nos variétés. En fait, grâce au recrutement d'un technicien (par notre laboratoire mais travaillant à Béja), on a pu avoir le maximum des données physiologiques et phénotypiques telle que :

* Date de levée * Date d'épiaison* Hauteur* Susceptibilité à l'Oïdium* Rouille B* Présence de barbe *forme de l'épi * Poids de 1000 graines * Enroulement des feuilles * Date de maturation, etc.

Toutes ces données ont été prises au cours de la saison 2010-2011. On compte prendre d'autres mesures durant la saison 2011-2012 et encore refaire les mêmes essais au niveau de la station de Kef (le climat diffère de celui de Béja) ; ce qui permettra d'avoir des moyennes et de mettre en relief l'interaction génotype environnement GXE.

Toutes ces données seront exploitées ultérieurement pour :

- l'identification de variétés portant des allèles favorables et qui pourraient être utilisés comme « donneur » dans les programmes d'amélioration variétale.
- Fichier phénotypique exploitable pour les études d'association.

- Eude de la diversité génétique

Les 80 variétés de blé dur de cette petite collection ont été génotypé moyennant 54 marqueurs SSRs. Ces marqueurs couvrent tout le génome du blé, soit 4 marqueurs par chromosome. L'analyse des résultats moyennant le logiciel GeneMapper version 4 est en cours.

1.4. *Etude in silico des gènes impliqués dans la résistance aux stress*

Après le séquençage complet de quelques céréales notamment le riz, l'orge, le maïs et le sorgho. Le blé est une céréale aux enjeux économiques très importants. L'amélioration de la production de blé est donc un sujet d'actualité. La compréhension de ses génomes et de leur évolution est un des moyens d'y contribuer. Le génome du blé, bien que incomplet, (seules les cartes physiques des chromosomes 1AS, 1AL, 1BS, 1BL, 3AS, 3AL, 3B, 3DS, 3DL, 6BS, 6BL parmi les 21 sont publiques), le séquençage du blé a reconnu l'avancement considérable tirant profit des technologies de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing) qui sont en train de révolutionner la génomique et leurs effets sont de plus en plus répandus. En outre, les méthodes de mesure d'expression du transcriptome, du protéome et de l'interactome permettent de relier l'information statique du génome à la dynamique de l'activité métabolique. On peut donc obtenir les séquences d'ensembles complexes de gènes et des descriptions dynamiques de leurs activités en grandes quantités. D'où, la bioinformatique peut apporter une aide importante :

- Dans l'analyse automatique d'un génome c'est-à-dire un grand groupe de séquences en tant qu'un ensemble via la génomique comparative.
- Dans l'étude des relations complexes comme les interactions au sein des réseaux protéiques, métaboliques et les cascades transcriptionnelles. L'étude formelle de systèmes complexes tels que les réseaux et les graphes qui aident à comprendre les propriétés intrinsèques de ces organisations biologiques.
- A la vérification objective et systématique d'hypothèses biologiques exprimées par un critère informatique ou mathématique et ce sur de grands ensembles de données.

Dans ce contexte et se basant sur les objectifs du Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes (LPAP) que j'ai entamé les deux premiers axes de recherches tirant profit des données publiques :

1- Construction du réseau d'interaction protéine-protéine chez les facteurs de transcription WRKY d'*Arabidopsis thaliana*.
2- Identification *in silico* des gènes candidats impliqués dans la résistance à la fusariose (FHB) en se basant sur les (FHB) QTLs chez le blé tendre *Triticum aestivum*.
3- Analyse *in silico* des réseaux d'interactions de voies signalétiques chez le blé. Cet axe fait partie du projet « Etude des voies de signalisation modulant la réponse des plantes aux stress de l'environnement » dans le cadre du contrat programme 2014-2017.

- **Construction du réseau d'interaction protéine-protéine chez les facteurs de transcription WRKY d'*Arabidopsis thaliana*.**

Nous nous sommes intéressés à étudier les interactions protéiques chez les facteurs de transcription de la famille WRKY chez *Arabidopsis thaliana*. Les raisons de ce choix sont : i) Les WRKY sont des facteurs de transcription impliqués d'une part dans la réponse aux stress biotique et abiotique et dans l'immunité de la planté d'autre part. ii) *Arabidopsis thaliana* est une plante modèle bien étudiée et son interactome est disponible dans des bases spécialisées depuis 2010.

Nous avons construit un réseau d'interaction de 74 membres de la famille des WRKY en intégrant les résultats issus du contexte génomique, de l'homologie entre les protéines et de leurs conservations entre les espèces ainsi que les données répertoriées dans les bases de données et de la bibliographie. Ensuite, ces interactions sont représentées sous forme de réseau d'interactions qui a l'avantage de permettre la visualisation simultanée des WRKY. Dans ce réseau, les nœuds représentent les protéines et les arêtes traduisent une interaction entre deux protéines. Cette représentation permet d'appréhender l'organisation générale et l'analyse des relations entre les protéines étudiées. Différentes caractéristiques topologiques permettent de caractériser les réseaux comme le degré qui correspond au nombre de connexions partagé avec ses « voisins ». Le degré de connexion des nœuds de certains réseaux suit une loi de puissance, c'est ce qui définit les réseaux « scale-free » couramment rencontrés en biologie. Les réseaux de ce type comportent un grand nombre de nœuds faiblement connectés et une minorité de nœuds très connectés communément appelés « hubs ». La suppression d'un nœud faiblement connecté n'a pas énormément d'influence sur la topologie du réseau, par contre, la suppression d'un hub peut totalement déstructurer le réseau initial. Afin d'identifier les hubs du réseau d'interactions entre les WRKY, nous avons calculé le degré de connexion ainsi que la centralité d'intermédiarité (betweeness centrality). Le degré correspond au nombre de connexions que partage un nœud avec ses voisins. Quant à la centralité d'intermédiarité est un indicateur qui mesure la capacité d'un nœud à connecter ses voisins. En d'autres termes, un nœud est central s'il est le point de passage obligé des autres nœuds. Les protéines ayant les valeurs supérieures de ces paramètres par rapport aux autres sont considérées comme des hubs du réseau. Cette approche a révélé que le réseau protéique des WRKY est de type scale-free impliquant des protéines hubs multifonctionnelles qui sont WRKY 70, WRKY40, WRKY 53, WRKY 60, WRKY 33 et WRKY 51 (**Fig. 13).**

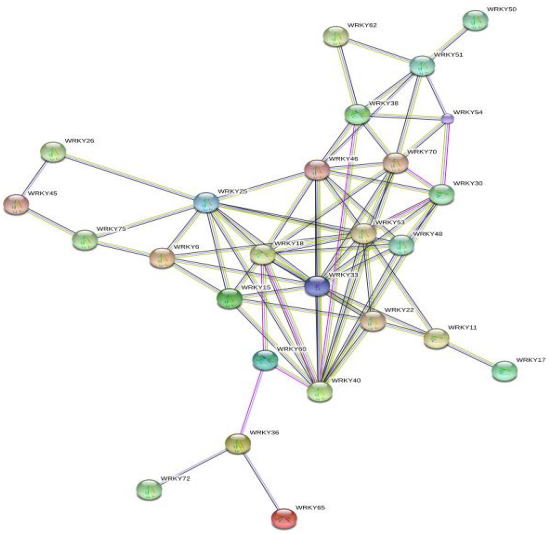
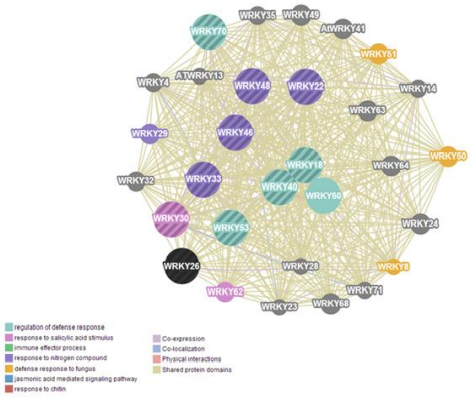


Figure 13. Réseau d'interaction protéine-protéine WRKY chez *Arabidopsis thaliana*

L'analyse fonctionnelle a montré sept modules impliqués essentiellement dans la réponse au stress biotique (Fig.14). En plus, les analyses ont montré que les protéines WRKY sont impliqués principalement dans la voie de signalisation plante-pathogène et leurs fonctions sont directement liés dans la réponse au stress et dans le processus du système immunitaire.



- **Identification *in silico* des gènes candidats impliqués dans la résistance à la fusariose (FHB) en se basant sur les (FHB) QTLs chez le blé tendre *Triticum aestivum*.**

La fusariose (FHB) causée par le champignon pathogène *Fusarium graminearum*, est une maladie destructive chez les céréales notamment le blé. FHB affecte les grains causant des pertes sévères de rendement au cours de la récolte. Selon la FAO, la fusariose provoque des pertes de production chez le blé dans le monde entier dépassant les 50%. 52 QTLs impliqués dans la résistance à la fusariose chez le blé ont été publiés par Buerstmayr *et al. 2009. Ces données nous ont servi comme point de départ pour identifier in silico des gènes candidats fonctionnels localisés dans les régions QTLs de la résistance à la fusariose. Notre approche qui utilise les marqueurs génétiques disponibles, des alignements avec les séquences disponibles de l'URGI suivis d'annotation du pipeline TriANNOT et d'annotation manuelle a fourni 38 protéines impliquées principalement dans la défense au stress, la régulation immunitaire et la détoxification cellulaire. Ce résultat est considéré comme pertinent puisqu'il fournit un point de départ pour les sélectionneurs de blé et phytogénéticiens pour améliorer les variétés de blé résistantes à la fusariose. En perspectives, ce travail pourrait être élargi pour les autres traits de stress biotiques et abiotiques afin de regrouper tous les résultats dans une base de données (« from QTL to genes ») que non seulement l'équipe mais la communauté scientifique qui s'y intéresse pourrait tirer profit.*

- **Analyse *in silico* des réseaux d'interactions de voies signalétiques chez le blé**

La Map kinase phosphatase chez le blé (TMKP1) joue un rôle important dans la régulation des voies de MAPK chez le blé lors d'une réponse à un stress. En outre, des expériences préliminaires d'immunoprécipitation indiquent que TMKP1 pourrait interagir avec LOX2, une lipoxygénase de blé

dur requise dans la biosynthèse de l'Acide Jasmonique (AJ). Ceci suggère que TMKP1 pourrait être aussi impliquée dans la régulation de la voie de l'AJ, et constitue ainsi un exemple unique d'étude de « crosstalk » de voies de signalisation chez le blé. Dans ce contexte et en complémentarité avec les résultats déjà trouvés dans le laboratoire (Zaidi et al., 2010 et 2012), nous envisageons ici de développer des approches bioinformatiques innovantes visant à explorer *in silico* ces voies signalétiques en identifiant les gènes régulateurs, les facteurs de transcription et leurs gènes cibles qui répondent stress. Ces approches visent essentiellement à élaborer d*es interactomes de protéines associées à TMKP1, et aux protéines de type JAZ.* De tels interactomes seront les premiers à développer chez le blé et pourraient constituer une nouvelle source d'information pour le développement d'approches de génomique fonctionnelle de tolérance aux stress chez les céréales. Ces réseaux d'interactions fourniront des renseignements sur des régulateurs associés à TMKP1, aux JAZs ou aux deux et qui pourraient être potentiellement impliqués dans les mécanismes de tolérances aux stress biotiques et abiotiques. Il est à noter qu'un *ab initio* network de *TMKP1* a été construit en intégrant les données de co-expression *TMKP1* disponibles chez le blé, et le riz. La comparaison entre le réseau du blé (TMKP1) et celui du riz (OsMKP1) a révélé que les protéines cibles communes sont essentiellement des protéines de résistance aux pathogènes (**Fig. 15**).

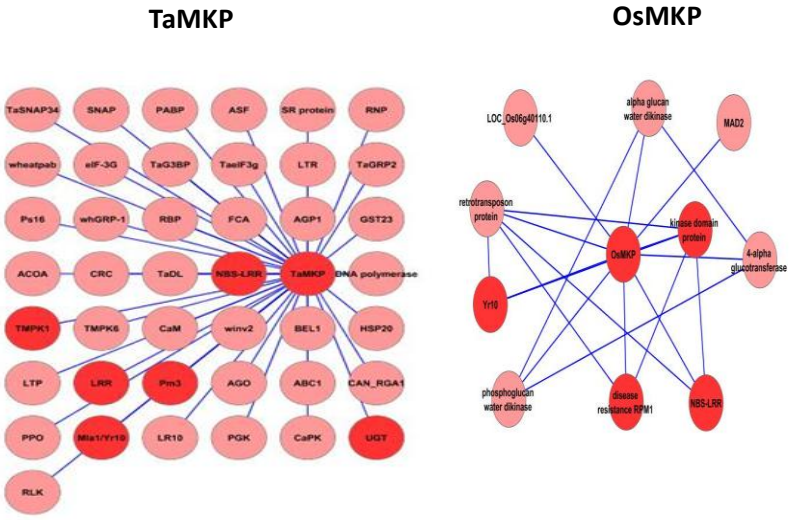


Figure 15 : Comparaison entre les résaux d'interaction de TaMKP (blé) et OsMKP (riz). Les protéines communes sont indiquées en rouge.

- **Etudes *in silico* des éléments cis régulateurs :**

Dans un premier temps, nous avons identifié les éléments de réponse aux stress présents dans les gènes JAZ de blé. Cette analyse a permis l'identification des cDNAs et des séquences génomiques. L'étude des profils d'expression des JAZ après exposition des plantes à différents types de stress est en cours. Ceci nous amènera à la prédiction d'un réseau de régulation de l'expression des gènes JAZ et notamment ceux impliqués dans la tolérance aux stress. Ces études serviront également de base pour l'identification chez le blé de facteurs de transcription clés régulant la réponse à divers types de stress. Enfin, nous envisageons à la lumière des résultats obtenus de développer notre propre base de données comportant l'ensemble des informations liées aux réseaux de régulation des gènes de réponse aux stress chez le blé.

- **Etude des protéines désordonnées chez le blé**

Dans le cadre de la modulation des voies de signalisation, nous avons récemment entamé un autre axe qui s'intéresse aux protéines désordonnées. Ces protéines très flexibles sont formées de régions non structurées qui changent sans cesse de conformation. Elles représentent environ 40 % des protéines humaines et 30% de celles d'*Arabidopsis thaliana* (Pietrosemoli *et al*., 2013). Cette étude suggère l'implication des protéines désordonnées dans l'adaptation au stress environnemental. En plus, il est intéressant de noter les résultats ultérieurs de l'équipe, démontrant des mécanismes cellulaires développés par les plantes qui leur permettent de s'adapter efficacement au stress. Ces mécanismes impliquent particulièrement des protéines désordonnées telles que les déhydrines et les LEA. C'est ce qui m'a motivé à identifier et caractériser toutes les protéines désordonnées dans le protéome du blé et plus largement dans les autres céréales.

Dans le même contexte, nous avons prédit les régions intrinsèquement désordonnées (intrinsically disorder regions (IDR)) dans les protéines chargées chez l'homme en se basant sur un travail ultérieur (Choura AND Rebaï, 2013). J'ai trouvé que 64% des protéines chargées hébergent significativement des régions désordonnées et sont capables d'interagir avec 283 partenaires. Ce travail consolide le rôle des protéines désordonnées et des interactions protéine-protéine. Cette partie fait l'objet d'une publication prochainement soumise dans *Proteins journal*. D'autant plus, ceci pourrait constituer une base comparative pour mieux explorer le rôle de ces protéines chez les céréales et notamment le blé et leurs relations avec la complexité des protéomes.

Projet 2 : Signalisation et mécanismes de tolérance aux stress

1. Etude du rôle de la MAP Kinase phosphatase du blé (TMKP1) dans les voies de signalisation régulant la réponse cellulaire aux stress abiotiques et biotiques.

La réponse aux stress salin et osmotique est un phénomène complexe qui fait intervenir plusieurs voies de signalisation, parmi lesquelles celle des MAPKs (mitogen activated protein kinases) joue un rôle déterminant. La modulation de l'activité des MAPK dépend de protéines phosphatases telles que les MAPK phosphatases (MKP). Ces MKP sont aussi connues sous le nom de DSP (phosphatases à double spécificité) puisqu'elle déphosphorylent à la fois les résidus sérine/thréonine et tyrosine des MAPK cibles. Malgré leur importance, seulement quelques MKP ont été caractérisées chez les plantes. Nous avons identifié la première MKP de blé (TMKP1) qui a une taille de 752 a.a et présente une forte homologie avec d'autres MKP de plantes. Comme ses homologues, TMKP1 possède dans la région N-terminale un domaine catalytique avec les motifs PTP-DSP (172-287 a.a), suivi d'un domaine similaire à celui de la gelsoline liant les filaments d'actine (291-379 a.a); et dans la partie C-terminale le domaine de liaison de la calmoduline (398-449 a.a).

Dans ce présent travail, nous avons poursuivi la dissection moléculaire de la fonction de TMKP1 ainsi que son implication dans la réponse d'*Arabidopsis* aux stress biotiques et abiotiques.

1.1 Régulation de l'activité de TMKP1 par les calmodulines

On s'est intéressée à étudier l'interaction de TMKP1 avec les CaMs. Pour cela on a effectué des expériences de GST-pull down en utilisant des formes recombinantes de TMKP1 (His_TMKP1) et de la calmoduline d'*Arabidopsis* AtCaM1 (GST_CaM1) qui présente 98% d'identité avec celle du blé. Après l'opération de pull-down et SDS-PAGE, des analyses par immunoblot utilisant un anticorps anti-TMKP1 ont montré que la protéine TMKP1 est capable de se lier à la CaM *in vitro* et que cette liaison

est dépendante des ions calcium. De plus, pour confirmer cette interaction, une forme tronquée de la TMKP1 (His CTMKP1) a été générée où la partie C-terminale les domaines de liaison aux CaMs (CaMBDs) a été éliminée. Lorsqu'elle est employée dans les tests de pull-down, cette forme mutée n'est plus capable de fixer la AtCaM1 ce qui démontre que les domaines CaMBDs sont indispensables à cette interaction TMKP1-CaM.

Suite à cette interaction TMKP1/AtCaM1 *in vitro*, la candidate a décidé d'investiguer si cette calmoduline a un effet sur l'activité catalytique de TMKP1 *in vitro*. L'activité phosphatase a été testée comme précédemment sur GST-TMKP1/ou His-TMKP1 en utilisant l'OMFP et en présence de la forme recombinante GST-AtCaM1. Les résultats obtenus ont révélé que l'activité diminue en présence d'AtCaM1/Ca^{2+} d'une manière dépendante de la dose de la CaM contrairement aux autres DSPs. En revanche, en présence des ions Mn^{2+} le complexe CaM/Ca^{2+} stimule l'activité phosphatase de la TMKP1. Cet effet est observé avec une concentration en ions Mn^{2+} variant de 0.05 mM. De manière intéressante le complexe CaM/Ca^{2+} n'a pas la capacité d'activer la forme tronquée His_CTMKP1, ce qui indique clairement que cette activation nécessite la fixation spécifique de la CaM à TMKP1 au niveau des domaines CaMBD. On a pu ainsi déduire que le complexe CaM/Ca^{2+} joue un double rôle sur l'activité phosphatase de la TMKP1 dépendant de la présence ou de l'absence des ions Mn^{2+}. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article publié dans la revue Biochimie (IF= 3.12) intitulé: « **The activity of the wheat MAP kinase phosphatase 1 is regulated by manganese and by calmodulin** »

1.2. Régulation de TMKP1 par les les protéines 14-3-3 :

A travers le logiciel scansite 3 (http://scansite3.mit.edu)/), un motif conservé de liaisons aux 14-3-3s de type I a été identifié au niveau de la position 574-580(KLPSLP).
La comparaison des séquences des autres DSPs identifiées montre que ces différentes phosphatases présentent des motifs de liaisons aux protéines 14-3-3 différents de point de vue taille, type et localisation. En effet, ce même motif de Type I (574-580) est présent au niveau de la structure de toutes les DSPs de monocotylédones étudiées, c'est un motif bien conservé entre le l'orge, Brachypodium et l'Aegilops (**KLPSLP**).

Afin de vérifier si TMKP1 et les protéines 14-3-3 peuvent interagir au sein des cellules de blé, des essais de co-immunoprécipitation (IP) ont été employées. Ces IP ont été réalisées sur des extraits de deux variétés Tunisiennes de blé dur en employant les anticorps anti-14-3-3 et anti-TMKP1. L'ensemble des résultats obtenus démontrent de manière claire que TMKP1 est capable d'interagir avec des protéines 14-3-3 *in vivo*. Mlle Mouna Ghorbel a aussi cherché à voir si la liaison des 14-3-3s a un impact sur l'activité catalytique de la phosphatase de blé. Comme elle ne dispose des 14-3-3 de blé, et étant donné que les protéines 14-3-3 sont bien conservées, la candidate a opté pour l'emploi de formes recombinantes de quatre 14-3-3s dont deux sont issues d'*Arabidopsis* (Phi et Omicron) et deux de la levure *S. cerevisiae* (BMH1 et BMH2). Des tests d'activité phosphatase similaires à ceux réalisés précédemment ont montré que TMKP1 augmente en présence de Phi, Omicron, ou BMH1 d'une manière dose dépendante. Les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} stimulent fortement l'activité de la TMKP1 en présence de ces 3 isoformes. Ces données suggèrent que les 14-3-3s pourraient agir de manière synergique avec des cations divalents spécifiques pour stimuler l'activité de TMKP1.

D'autre part, Mlle Mouna Ghorbel a démontré que la présence simultanée du complexe CaM/Ca^{2+} et des 14-3-3, résulte en des effets différents en fonction de l'isoforme ajoutée. Alors qu'en présence d'Omicron ou BMH1, l'activité diminue, celle-ci a presque doublé en présence de Phi. En revanche, l'ajout de Mn^{2+} en plus des deux régulateurs (CaM/Ca^{2+} et les 14-3-3s), aboutit toujours à une stimulation de l'activité de TMKP1, quel que soit la nature de l'isoforme ajoutée. Ces effets différentiels des régulateurs ainsi que du Mn^{2+} reflètent la complexité des mécanismes de régulation à la quelle pourrait être soumise TMKP1 *in vivo*.

Les résultats obtenus dans cette partie ont fait l'objet d'un article en cours de préparation, intitulé : « **Regulation of the wheat MAP Kinase Phosphatase 1 by 14-3-3 proteins ».**

1.3 Contribution de TMKP1 dans les mécanismes de défense

On a ensuite évalué les niveaux de résistance chez Arabidopsis après sur-expression de *TMKP*1. Ceci a été mené chez deux écotypes différents (Col0 et Ws4) et aussi bien chez des plantes sauvages que des plantes mutantes (dans le gène *AtMKP1*). Les expériences réalisées montrent que la mutation d'*AtMKP1* et la sur-expression de TMKP1 chez les plantes sauvages (lignées 2-1 et 6-1) et chez les mutants des deux écotypes étudiésdes différentes lignées citées plus haut à une infection par la bactérie pohytopathogène *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. Après inoculation, on a constaté que l'effet de la surexpression de TMKP1, sur la réponse des plantes aux infections bactériennes diffère selon l'écotype. Chez l'écotype Ws4, les mutants exprimant TMKP1 sont plus sensibles au pathogène que les plantes sauvages. En revanche, chez l'écotype Col0, la sur-expression de TMKP1 améliore la résistance des plantes à *P.syrinage.* Cet effet positif a été observé aussi bien chez les plantes sauvages Col0 que chez le mutant. A l'issue de tous les tests de stress abiotiques et biotiques, on a fini par conclure que le gène TMKP1 est fonctionnel chez *Arabidopsis* et semble agir chez l'écotype Col0, de manière antagoniste par rapport à l'endogène (AtMKP1). En effet, TMKP1 agirait comme régulateur positif de la tolérance au stress salin et de la résistance à *P.syrinage,* tandis qu'AtMKP1 a été décrit comme étant un régulateur négatif de la réponse à ces stress.

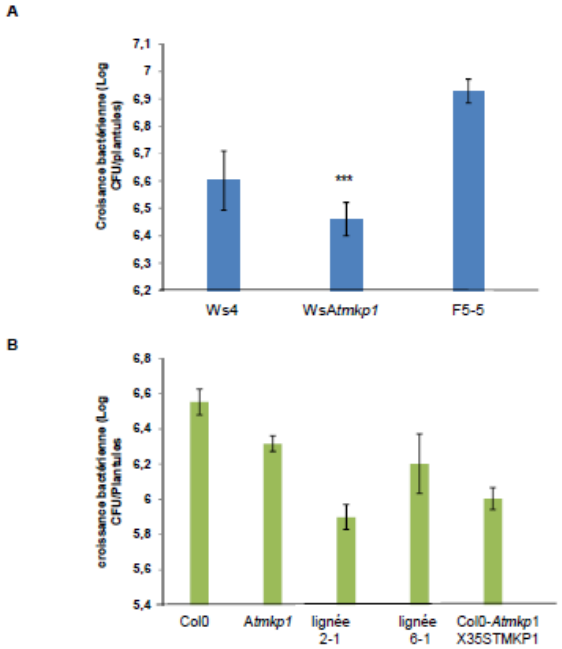


Figure 16 : Mesure de la croissance bactérienne au niveau des feuilles des différents écotypes Col0 et Ws4

Des plantules des différentes lignées cultivées en milieu liquide ont été infectées par un inoculum de *P.syrinage* DC3000 à une concentration de (1.10^{-7} cfu/ml). L'analyse de la croissance bactérienne dans les feuilles a été réalisée après broyage des feuilles après 1éh de traitement. Le broyat est étalé sur boite de Pétri sur milieu Lb solide contenant l'antibiotique adéquat: Rifampicine (50µg/ml) puis comptage du nombre de colonies. Les résultats sont exprimés selon une échelle logarithmique (log).

(***) Indiquent que les valeurs sont significativement différents du controle selon le test de student ($p < 0.05$).

2. Etudes physiologiques et moléculaires des interconnexions entre les voies de signalisation régulant l'homéostasie du phosphore et du zinc chez les plantes.

En raison de la forte adsorption des phosphates aux éléments minéraux du sol, le phosphore (P) est largement indisponible pour les plantes, ce qui constitue une contrainte majeure à leur croissance et leur développement. Par conséquent, la fertilisation en phosphates est essentielle pour la production agricole. Chaque année, une grande quantité d'engrais phosphatés est appliquée aux terres cultivables mais seulement 10 à 20% du phosphore ajouté est prélevé par les cultures. La plus grande quantité du phosphore ajouté au sol est rapidement fixée en fraction inorganique et fraction organique très peu disponibles pour les racines des plantes. Par conséquent, l'année suivante une nouvelle fertilisation sera quand même requise et la quantité de P qui se retrouve dans l'environnement augmente ainsi d'année en année. Ainsi, l'apport important d'engrais phosphatés est non seulement coûteux mais cause des problèmes de pollution environnementale. En fait, 50-80% du P total dans les sols agricoles existe sous forme de P organique dont le composant le plus prépondérant est l'acide phytique qui n'est pas disponible aux plantes sauf s'il est hydrolysé par des enzymes spécifiques « les phytases ». Au sein du LPAP au CBS, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une phytase PHY US417 de la souche de *Bacillus subtilis* isolée par le laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes.

Dans ce contexte, on a mené des études de croissance *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana* dans des conditions de carence en P. Ses résultats ont montré que la phytase PHY US417 ajoutée au milieu a la capacité de stimuler la croissance des plantes d'*Arabidopsis* à partir d'un milieu de culture dépourvu en P et contenant l'acide phytique (AP).

En parallèle, une série de clonages a abouti à la génération de vecteurs binaires contenant la phytase PHY US417. Des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* surexprimant cette phytase ont été ainsi produites après transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Dans un premier temps, des analyses moléculaires ont permis de confirmer l'intégration et l'expression de la phytase PHY US417 chez ces lignées. Ensuite, des tests d'activité ont démontré que l'activité phytasique chez les plantes surexprimant PHYUS 417 est 8 à 28 fois supérieure aux plantes sauvages. A partir de ces lignées, deux ont été sélectionnées pour mener des études physiologiques approfondies en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, SupAgro Montpellier. Lors de son séjour au sein de l'équipe Française, Nibras a mené des analyses chromatographiques (HPIC) sur des extraits végétaux pour mesurer l'accumulation des principaux anions inorganiques. Les résultats obtenus ont révélé que dans des conditions de carence en P, les plantes transgéniques accumulent dans leurs tiges des niveaux de Pi et de sulfate nettement supérieures (50%) à ceux des plantes sauvages. L'ensemble de ces résultats a permis d'expliquer la meilleur croissance observée chez les lignées transgéniques après un stress par manque de P. Le dosage d'AP montre que les lignées testées en contiennent des teneurs nettement

inférieures que celles enregistrés chez le témoin (plantes sauvages) . En outre des analyses d'expression des gènes impliqués dans le transport du phosphate et du sulfate par PCR quantitative ont montré l'induction de ces transporteurs ainsi que de deux gènes impliqués dans la voie de signalisation du P.

L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans Plant and Cell Physiology et intitulé "Over-expression of the Bacterial Phytase US417 in Arabidopsis Reduces the Concentration of Phytic Acid and Reveals Its Involvement in the Regulation of Sulfate and Phosphate Homeostasis and Signaling".Plant Cell Physiol. 55: 1912-1924.

D'autre part, et étant donné que l'AP affecte par son effet chélateur la biodisponibilité de différents éléments minéraux, nous avons voulu ainsi tester l'effet de la réduction du taux d'AP sur la réponse des plantes à la carence d'autres minéraux en particulier le zinc. Ces dernières années des recherches ont montré que la complexité des mécanismes de régulation de l'homéostasie des ions P et de Zn. En effet l'application excessive des engrais phosphatés entraine la diminution de la teneur en Zn dans certaines plantes comme le blé et le maïs, alors que l'application excessive d'engrais Zn cause une baisse de la teneur en Pi dans les plantes. Chez l'orge, la carence en Zn entraîne une suraccumulation du Pi dans les feuilles. La suraccumulation de Pi en réponse à une carence en Zn est probablement en partie le résultat d'une induction spécifique de l'expression des transporteurs de P. Ces travaux suggèrent l'existence d'une co-régulation entre l'homéostasie du Zn et celle du Pi chez les plantes, et la présence d'interconnections entre les deux voies de signalisation liées à ces deux éléments. Dans ce contexte, on a effectué une série de tests de croissance sur les lignées transgéniques *in vitro* dans différents conditions de carence (traitements simples et combinés**)** pour déterminer les paramètres phénotypiques et doser la teneur du phosphate et du zinc au niveau des feuilles (en cours).

3. Isolement du gène TRH de blé, impliqué dans le contrôle cellulaire

Parmi les gènes candidats présents au sein du Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes du CBS, nous avons isolé l'homologue de blé dur de la protéine RSS1 isolée et décrite par Ogawa *et al.* (2011) chez le riz. Le mutant *rss1* de riz (rice salt-sensitive 1) est hypersensible au stress salin. Ce mutant provient du criblage d'une collection de mutants par insertion du transposon *Tos17* soumis à un stress salin. Trois mutants indépendants ont été identifiés. Tous les trois présentent le même phénotype : la plante mutante est naine en conditions de stress salin mais croît normalement en absence de stress. Plus précisément, *rss1* présente une inhibition irréversible de la croissance après une exposition à 150 mM de NaCl pendant deux semaines. Ceci se manifeste par une diminution générale de la taille de la plante et plus particulièrement au niveau de la racine principale où les tailles des zones méristèmatiques et d'élongation sont réduites. Cette diminution est concomitante à une réduction du nombre des cellules dans les deux zones suggérant un défaut dans le contrôle du cycle cellulaire. Chez *rss*1, la taille de SAM (Shoot Apical Meristem) diminue sous l'effet de la salinité, mais pas en conditions normales. Le nombre de cellules dans le SAM diminue aussi. Cette mutation perturbe ainsi des réponses requises pour l'adaptation à la salinité et la régulation du cycle cellulaire.

Le clonage du gène muté dans *rss1* révèle un gène codant pour une protéine de 243 aa. Ce gène est présent chez tous les monocots mais semble absent chez les eudicots comme *A. thaliana*. La protéine RSS1 s'exprime dans les cellules en division, et sa stabilité est régulée par 'la voie de dégradation du protéasome ((APC/C)- 26S proteasome) de par la liaison au motif D-box. Ceci entraine une

accumulation préférentielle de la protéine lors des phases G1/S suggérant sa fonction dans la régulation de la transition G1/S.

Par des expériences de double hybride chez la levure, il a été montré que RSS1 interagit avec une protéine phosphatase1 (PP1), qui régule plusieurs processus cellulaires incluant le cycle de division cellulaire. RSS1 serait requise pour la balance entre la division cellulaire et la différenciation et régulerait ainsi la bonne organisation du méristème. Ainsi RSS1 assurerait le maintien d'un certain taux de division cellulaire sous les conditions de stress et permettrait de protéger les cellules méristématiques des effets délétères du stress. Cette protection permettrait un meilleur retour à la croissance une fois le stress terminé (Ogawa et al, 2011).

Un cDNA de blé tendre (*Triticum aestivum*) disponible dans la base de données TIGR (http://www.jcvi.org/wheat/index.php; TA75750_4565) a montré une homologie de 68% au niveau protéique avec la protéine RSS1 de riz. Deux variétés tunisiennes de blé dur présentant des profils de tolérance opposés au stress salin (Om Rabiaa, variété tolérante-Mahmoudi, variété sensible) ont été utilisées pour le clonage de l'homologue. En utilisant ces deux variétés, un cDNA d'environ 1kb a été cloné comportant les régions 5' et 3' UTR ainsi qu'une phase ouverte de lecture présentant une forte homologie avec le gène de riz. Ces homologues ont été appelés TRH1 pour Triticum RSS1 Homolog 1.

L'analyse des séquences de ces deux amplicons, a montré que les deux séquences issues des deux variétés de blé dur sont identiques. La comparaison de cette séquence avec la séquence disponible de blé tendre montre une grande homologie des séquences nucléotidiques (98%) et protéiques (98%, Figure 1). On remarque toutefois que 5 acides aminés sont modifiés. Ces modifications ne concernent pas les acides aminés des motifs DEN, D-BOX et WAGE décrits par Ogawa et al. (2011), D-box et la DEN-box étant des motifs essentiels pour la régulation post-traductionnelle de RSS1 par le protéasome. Le blé tendre étant plus tolérant aux conditions salines que le blé dur, la signification de ces polymorphismes sur la tolérance reste cependant à étudier.

```
TRH1   1    MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKRIDGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKG   60

Cons        MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKR DGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKG

TaTRH  1    MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKRADGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKG   60


TRH1   61   HPLKDRSVLKDKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVEGTHFTGNDAQR   120

Cons        HPLKDRSVLKDKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVEGTHFTGNDAQR

TaTRH  61   HPLKDRSVLKDKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVEGTHFTGNDAQR   120


TRH1   121  LDSDKIDKRVKKKVEKITSALHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDIS   180

Cons        LDSDKIDKRVKKKVEKITSALHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDIS

TaTRH  121  LDSDKIDKRVKKKVEKITSALHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDIS   180
```

```
TRH1   181  GRLSISGDKAKLTEDSFDEVELDSYSFLEDKPVEFQLRDEMSLYPWSLESVN  232

Cons        GRLSISGDKAKLTEDSFDEVELD  SFLEDKPVEFQLRDE+S YPWSLESVN

TaTRH  181 GRLSISGDKAKLTEDSFDEVELDCCSFLEDKPVEFQLRDEISRYPWSLESVN  232
```

Figure 17 : Les séquences des protéines TRH et TaTRH présentent une forte homologie. Alignement des séquences peptidiques entre TRH1 issu du blé dur et TaTRH (blé tendre (*Triticum aestivum*) issu de la base de données TIGR : TA75750_4565). Les acides aminés surlignés en rouge sont polymorphiques. Les acides aminés surlignés en jaune, rose et bleu représentent les acides aminés des motifs DEN, D-box et WAGE respectivement.

Après analyse par BLASTp (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins), la protéine TRH1 est homologue avec des protéines prédites d'orge (93% d'identité), de *Brachypodium distachyon* (80% d'identité) et à 59% avec la protéine RSS1.

Le cDNA a été cloné dans le vecteur pGBKT7 permettant la formation d'une protéine de fusion avec le domaine de liaison à l'ADN dans le but d'effectuer le criblage d'une banque de double hybride (banque de cDNA de blé stressé) à la recherche de protéines de blé interagissant avec TRH. Ce criblage est en cours. Par ailleurs, le même cDNA a été cloné dans le vecteur d'expression de levure pYES2 afin de voir l'effet de la surexpression de TRH1 sur la division cellulaire et la tolérance au stress salin de la levure sauvage et de mutants sélectionnés. Cette étude est en cours.

4. Isolement et caractérisation des gènes appartenant à la famille de facteur de transcription répondante à l'éthylène ERF (Ethylene-response factor) à partir de blé dur

Les facteurs de transcription du type ERF sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus biologiques et ont été, récemment, reconnu comme acteurs majeurs dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Par conséquent, ils peuvent constituer un outil puissant pour la manipulation génétique des plantes en vue de l'amélioration de leurs tolérances aux stress salin et hydrique. En se basant sur l'alignement de séquences codant plusieurs protéines ERF chez diverses céréales et en appliquant la technique de TAIL-PCR, nous avons isolé un gène complet chez le blé dur codant pour un ERF et comportant la région promotrice, un intron et deux exons ainsi qu'une région 3' non codante. Le cDNA correspondant a aussi été isolé. L'expression de cet ERF est fortement induite suite à l'application du stress salin, hydrique, froid et hormonal (Figure : stress salin comme exemple). En plus, son expression hétérologue permet d'améliorer la tolérance de la levure à ces différents types de stress (**Figure 18**: stress salin comme exemple). L'expression transitoire de cet ERF chez des cellules de tabac à permis de vérifier sa localisation nucléaire (Figure 18: localisation nucléaire) et sa capacité de lier des séquences d'ADN cibles (Figure 18: Test d'activité GUS sous le contrôle d'un élément *cis* reconnu par l'ERF). L'ERF a été introduit chez des plantes de tabac et l'étude de son effet sur l'amélioration de la tolérance des plantes aux stress abiotique est en cours. En plus, d'autres lignées de tabac transgéniques exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de l'ERF sont en préparation.

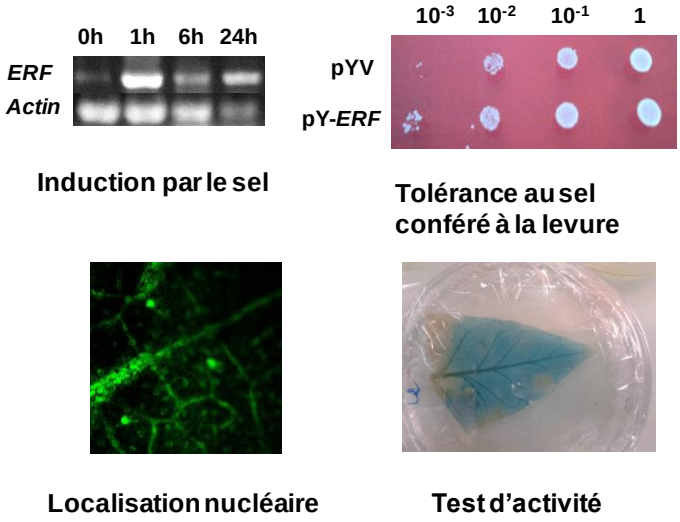


Figure 18 : Etude de l'expression et la localisation d'un ERF isolé du blé sous condition de stress salin

Projet 3. Exploitation du potentiel génétique d'une graminée halophyte (*A. littoralis*) pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques chez les céréales.

Aeluropus littoralis est une monocotylédone halophyte de type C4 appartenant au genre *Aeluropus Trin, Clorideae*. C'est une plante herbacée, pérenne, considérée comme plante fourragère naturelle et se développe dans les zones salées comme les sebkhas. A partir de 300mM de NaCl la plante exprime un phénotype d'adaptation au stress salin par le développement d'un système racinaire très important, la diminution de la taille des feuilles et par l'excrétion du sodium à travers les glandes à sel. Dans le but d'améliorer la tolérance de certaines variétés de blé aux stress abiotiques, nous avons utilisé *Aeluropus littoralis* comme source de gènes ayant un rôle dans les mécanismes de tolérance à ce type de stress. Afin d'atteindre ce but, une première analyse du transcriptome différentielle chez la plante halophyte *Aeluropus littoralis* a permis d'isoler 492 ESTs parmi eux certains cDNAs complets dont 105 ESTs (20%) n'ont aucune homologie avec des séquences connues dans les bases de données de protéines qui peuvent être considérées comme des nouveaux. Ces derniers pourront être transférés vers le blé dur afin d'améliorer leur tolérance aux stress abiotiques. L'étude du profil d'expression des 105 ESTs isolé à partir de la banque cDNA racine et feuille *d'Aeluropus littoralis* stressée à 350 mM NaCl ou à 15% PEG8000 pendant 0, 6h, 24h, 48h et 72h par qRT-PCR a permis de sélectionner des gènes qui réponds aux stress abiotiques. Les résultats de la qRT-PCR ont montré que certains ESTs s'expriment d'une façon différentielle en fonction du stress et tissus spécifique. Ces ESTs ont été classés comme suivant :

A: **27** ESTs avec un profil d'expression qui ne répond pas aux stress salin et hydrique

(**RE<2.5**)

B: **48** ESTs avec un profil d'expression significativement relié aux stress salin et hydrique (**2.5**

≤ RE< 10)

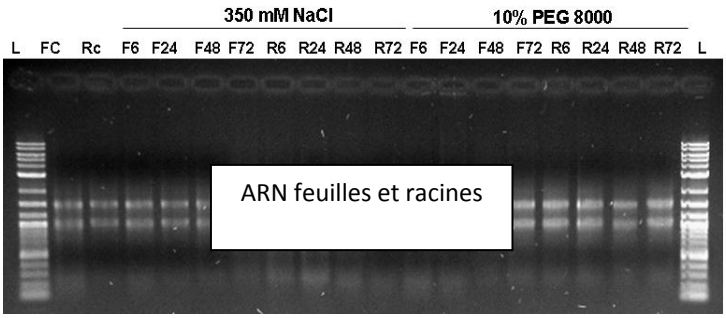
D: **30** ESTs avec un profil d'expression très significativement relié aux stress salin et hydrique

(**RE≥10**)

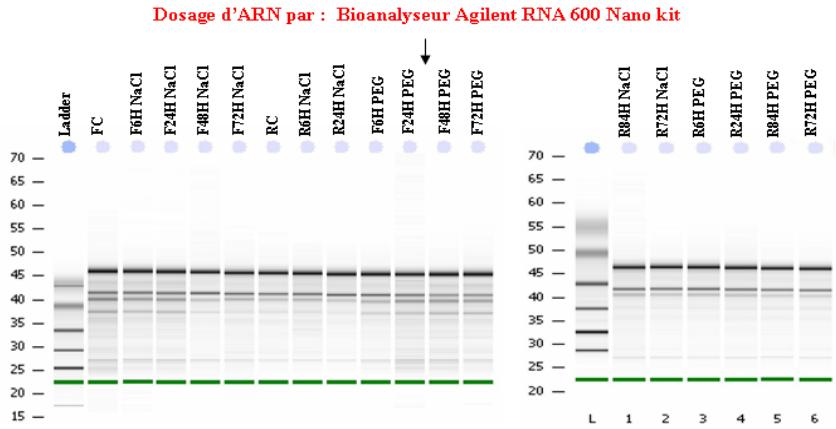
1. *Isolement et séquençage des full-length des gènes à partir d'A. littoralis*

Au cours de l'année 2013, nous avons entamé l'isolement des gènes complets par la technique RACE-PCR des 30 ESTs analysés par real-time qPCR et qui ont une expression relative très significativement relié aux stress salin et hydrique (**RE>4**). Les plantes *d'Aeluropus littoralis* ont été stressées en condition hydroponique par NaCl (300 mM) et par le PEG (10% 8000) pendant 6h, 12h, 24h, 48h et 72h. Les ARN totaux ont été extraits à partir des feuilles et des racines par RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). La qualité et la quantité des ARN ont été déterminées par dosage au nono drop Bioanalyseur Agilent 2100. La synthèse des cDNAs feuilles et racines ont été faites par le Kit RACE-PCR (clontech). Par la technique RACE- PCR nous avons pu isoler 11 nouveaux gènes complets. Ces derniers ont été clonés dans le TOPO-PCR2.1 (Invitrogen) afin d'être séquencés par M13F et M13R dans la boite « GATC » (**Figure 19**).

(**A**)



(**B**)



(**C**)

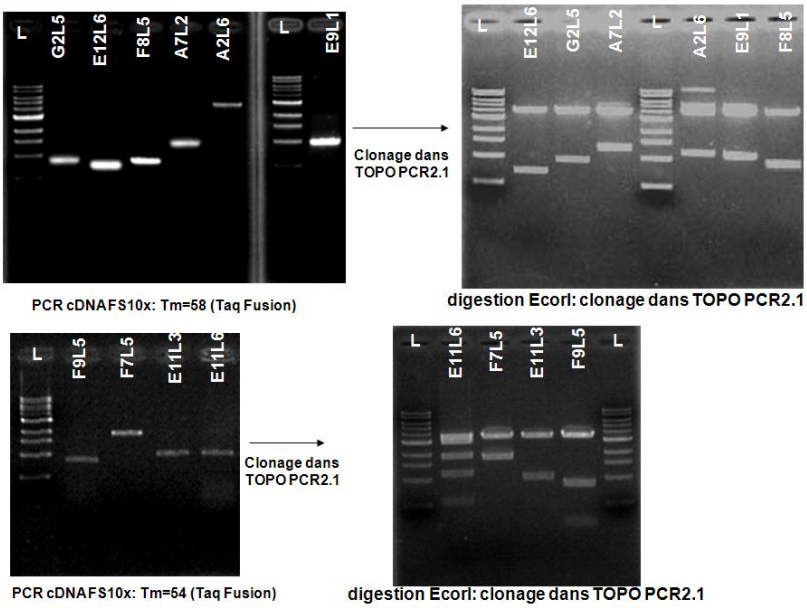


Figure 19: Isolement et clonage dans TOPO-PCR2.1 des 11 gènes isolés à partir *d'Aeluropus* par la technique RACE-PCR. (**A**) : ARN des feuilles et des racines extraits à partir *d'Aeluropus littoralis* stressés par 300 mM NaCl et 10% PEG 8000. (**B**) Dosage d'ARN par le Bioanalyseur Agilent RNA 600 Nano Kit. (**C**) Résultats de RACE-PCR des 11 gènes isolés et clonage dans TOPO-PCR2.1

L'analyse des séquences des gènes sur NCBI par BlastX a montré que ces 11 gènes n'ont aucune homologie avec des séquences connues dans les bases de données de protéines et qui peuvent être considérées comme des nouveaux.

Le tableau 1 ci-dessous résume les résultats de séquençage des 11 gènes complets isolés par la technique RACE-PCR :

Seq.Name	Seq.Description	Seq. Length (pb)	e-value	M.Similarity
F8RSTL5	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g030750 [Sorghum bicolor]	959	2.62124E-106	77.4%
F9RSTL5	hypothetical protein [Zea mays]	921	1.49133E-21	73.0%
E11RSTL3	hypothetical protein [Zea mays]	1054	5.75495E-21	85.8%
E12RSTL6	hypothetical protein SORBIDRAFT_0010s013050 [Sorghum bicolor]	714	3.24569E-12	72.8%
E11RSTL6	Os03g0282900 [Oryza sativa Japonica Group]	1071	2.2663E-97	79.8%
G2RSTL5	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	762	2.33214E-10	83.0%
A2RSTL6	hypothetical protein OsJ_28438 [Oryza sativa Japonica Group]	2367	0.0	81.8%
E9RSTL1	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100834526	834	2.44587E-41	73.8%
A7RSTL2	hypothetical protein SORBIDRAFT_08g003160 [Sorghum bicolor]	1336	4.41375E-114	71.0%
E3RSTL6	trafficking protein particle complex subunit 1	592	4.57127E-79	94.0%
F7RSTL5	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g029410 [Sorghum bicolor]	1764	5.18842E-32	79.8%

Les 11 nouveaux gènes isolés seront cloné dans une deuxième phase dans des vecteurs binaires afin d'être transformer dans le tabac (utilisé comme plante modèle) dans le but de valider leur rôle dans la tolérance aux stress hydrique et salin.

2. Etude du promoteur du gène AlMYB

La salinité et la sécheresse sont deux stress abiotiques majeurs affectant la croissance des végétaux. Cependant, l'amélioration de la tolérance des plantes cultivées aux stress abiotiques constitue un des objectifs les plus importants en agriculture. Il a été rapporté que dans certains cas la surexpression de gènes conférant une tolérance aux stress sous le contrôle de promoteurs constitutifs peut être accompagnée par un effet néfaste sur le développement des plantes transgéniques. Devant cette situation, la recherche de promoteurs inductibles par les divers types de stress est devenue une alternative indispensable pour résoudre ce type de problème. Dans des travaux antérieurs, nous avons isolé le gène *AlMYB* à partir *d'Aeluropus littoralis* qui code pour une protéine de type R2R3-MYB. Nous avons pu démontrer par qPCR que ce gène est inductible dans *A. littoralis* par : le froid 4°C, ABA 100µM, NaCl 300mM et PEG 20%. En se basant sur ces éléments et dans le but d'étudier sa région régulatrice, nous avons entamé dans le cadre d'un mastère de recherche avec la faculté des sciences de Gafsa, des travaux visant l'isolement et la caractérisation de la région régulatrice du gène *AlMYB*. Par la technique « *Chromosome walking* » nous avons pu isoler 1260pb à partir du site d'initiation de la transcription **(+1)** (**Figure 20**). L'analyse de séquence par le logiciel Proscan (version 1.7, http://www-bimas.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/proscan) a montré la présence du site d'initiation de la transcription (TSS:1) à la position 1193 et la boite **TATA** à la position -30 par rapport à **TSS**.

L'analyse de séquence en utilisant les bases de données PLACE et PlantCARE a permis de mettre en évidence la présence de nombreuses boites régulatrices répondant à différents types de signaux (hormonaux, lumière, froid, sécheresse, réponse aux stress,..) nécessaires à la régulation de l'expression des gènes induits par des stress biotiques et abiotiques (**Tableau 2**). En plus, l'analyse a révélé la présence de plusieurs sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription tels que: MYB, MYC, WRKY et Dof. Le promoteur du gène *AlMYB* a été cloné dans le vecteur binaire pCAMBIA1301 en fusion avec le gène *gusA* afin d'être transformé dans la souche LBA4404 *d'Agrobactérium tumefaciens* pour la transformation génétique du tabac.

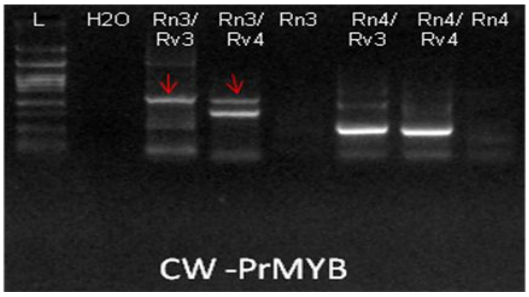


Figure 20 : Isolement du promoteur du gène *AlMYB* par la technique « *Chromosome Walking* » à partir *d'Aeluropus littoralis*

Tableau 2 : Putatif éléments cis-régulateurs de la séquence promotrice du gène *AlMYB* prédit par les programmes PLACE et Plant Care (HUhttp://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/htmlUH) and PLACE (http://www.dna.affrc).

Function/responsive	Putative *cis*-element/consensus	Position[a]	Reference
Early responsive elements in dehydration	ABRELATERD1	-91	Simpson et al. (2003)
	ACGTATERD1	+92	Simpson et al. (2003) Kaplan et al. (2006)
	ABRERATCAL	+294, +384, -385	
Light-responsive elements	GT1CONSENSUS	+336, +548, +554, +526	Terzaghi et al. (1995)
	SORLIP1AT	+366,+463,-446	Hudson et al. (2003)
	SORLIP2AT	+140, +285, -141, -264	Hudson et al. (2003)
	ACE	-70	PlantCare
Heat- responsive element	HSE	+519	PlantCare
Salicylic acid response element	TCA-element	+322	PlantCare
Wounding activation gene elements	WBOXNTERF3	+8	Nishiuchi et al. (2004)
Anaerobic induced gene elements	ANAERO1CONSENSUS	+529	Mohanty et al. (2005)
	ARE	-312	PlantCare
Calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein	CGCGBOXAT	+252, +295, +385	Yang et al. (2002)
Core promoter element around -30 of transcription start	TATABOX5	-338	Tjaden et al. (1995)
Transcription factor binding sites	MYBATRD22	+389	Abe et al. (1997)
	MYBCORE	-289	Urao et al. (1993)
	MYBCOREATCYCB1	+290, +358	Planchais et al. (2002)
	DOFCOREZM	-232, -264, +364, +369, +479, -490, +572, +578	Yanagisawa et al. (1999)
	WRKY71OS	+16	Zhang et al. (2004)
	LIM1	+123, +177, +217, +272, +396, -441	TRANSFAC
	MYB.Ph3	-199, -498	TRANSFAC
	Dof1	-471, +459	TRANSFAC
	ATHB-5	-341	TRANSFAC

Programme 2 : Biopesticides

Responsable : Pr. Slim Tounsi

1-RESUME

2- OBJECTIFS ET BUTS

3- INTITULE DES PROJETS DEVELOPPES

Projet 1 : Etude et Production de bioinsecticides d'origine microbienne et végétale

Partie A : Etude et Production des bioinsecticides à base de delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* – Mise au point d'un procédé de production

Partie B : Etude et Production des bioinsecticides à base de protéines Vip (Vegetative Insecticidal Proteins) de *Bacillus thuringiensis*

Partie C : Les bioinsecticides d'origine végétale et algale

Projet 2 : Les biofongicides d'origines microbienne et végétale

Projet 3 : Les Bactéricides d'origines microbienne et végétale

4- RESUME DES RESULTATS OBTENUS:

PROJET 1 : ETUDE ET PRODUCTION DE BIOINSECTICIDES D'ORIGINE MICROBIENNE ET VEGETALE

Partie A : Etude et Production des bioinsecticides à base de delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis*

I. Bioinsecticides actifs contre les diptères

I-1- Synergie d'action de la protéine cytolytique Cyt1Aa avec la δ-endotoxine Cry4Ba de la sous-espèce *israelensis* contre des larves d'*A. aegypti*

L'application de combinaisons de toxines Cry et Cyt de *B. thuringiensis israelensis* s'est montrée beaucoup plus toxique que l'utilisation de chacune individuellement contre les larves de moustiques. La compréhension du mécanisme moléculaire de la synergie des protéines cytolytiques Cyt avec les toxines Cry pourrait avoir d'importants impacts sur le développement des stratégies de gestion de la résistance aux toxines Cry dans les programmes de contrôle des moustiques. Dans ce contexte, nous avons réussi à mettre en évidence que l'amélioration de la toxicité de Cry4BLB est le résultat de son interaction avec Cyt1A98 ce qui a facilité et amélioré, (i) d'une part, la fixation de cette toxine (Cry4BLB) sur les BBMV de la membrane de l'intestin larvaire (**Figure 1**), (ii) d'autre part, l'oligomérisation de Cry4BLB responsable de la formation des pores au niveau de la membrane intestinale des larves cibles. Il a été rapporté que Cyt1Aa joue un rôle similaire avec la toxine Cry11Aa contre *A. aegypti* ce qui confirme le

grand intérêt de cette protéine cytolytique en tant que moyen de suppression de résistance aux toxines Cry de *B. thuringiensis*.

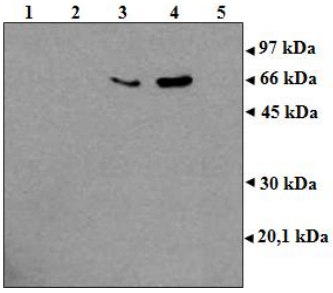


Figure 1 : Mise en évidence de l'interaction de la toxine Cry4BLB avec les BBMV d'*A. aegypti* en présence et en absence de la protéine cytolytique Cyt1A98 par Western blot en utilisant des anticorps anti-Cry4Ba.

Voies : 1- culot Cry4BLB seule ; 2- culot Cyt1A98 seule ; 3- culot Cry4BLB incubée avec BBMV; 4- culot Cry4BLB incubée avec BBMV pré-incubés en présence de Cyt1A98 ; 5- culot Cyt1A98 incubée avec BBMV.

I-2- Etude de l'interaction *in vivo* de la protéine chaperonne P20 avec la delta-endotoxine Cry4B

Pour comprendre l'origine du blocage de l'activité insecticide observé en appliquant la δ-endotoxine Cry4BLB produite en présence de P20, nous nous sommes proposés d'investiguer le mode d'action de cette toxine pour mettre le doigt sur l'étape défaillante. Il a été montré qu'une co-expression avec P20 a changé les propriétés de solubilisation des cristaux Cry3A. La solubilisation des cristaux et la libération des protoxines est une étape déterminante du mode d'action des toxines Cry. Alors, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la solubilisation des cristaux Cry4BLB produites par les transformants HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry4BLB* et HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry4BLB*.

Pour mettre en évidence l'impact de la protéine chaperonne P20 sur l'étape de solubilisation des cristaux Cry4BLB, nous avons comparé la solubilité de ces derniers produits par la souche HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry4BLB* (en présence de P20) par rapport à ceux produits par HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry4BLB* (en absence de P20) aux pHs 8,5 et 10,5 et pendant 2 et 24 h. Nous avons remarqué que les cristaux produits par HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry4BLB* se sont montrés moins solubles comparés à ceux du contrôle HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry4BLB* (**Figure 2**). En effet, ces derniers ont été complètement solubilisés à des valeurs de pH de 8,5 et 10,5. Cependant, les cristaux Cry4BLB, produits en présence de P20, présentent une solubilité relative ne dépassant pas les 33 %. Ainsi, nous pouvons conclure que la présence de la protéine chaperonne P20 a profondément modifié les propriétés de solubilité des cristaux de Cry4BLB. La perturbation du processus de solubilisation pourrait être due à des modifications de la structure tertiaire des protoxines Cry4BLB formés en présence de P20. Cette diminution de la solubilité des cristaux Cry4BLB produits en présence de P20, à des valeurs de pH caractéristiques des intestins des larves de Diptères, est en corrélation avec le blocage de leur activité larvicide. Les résultats présentés suggèrent que les variations de toxicité entre les deux types d'inclusions Cry4BLB (produit en présence ou absence de P20) pourraient être liées à leurs propriétés de solubilisation.

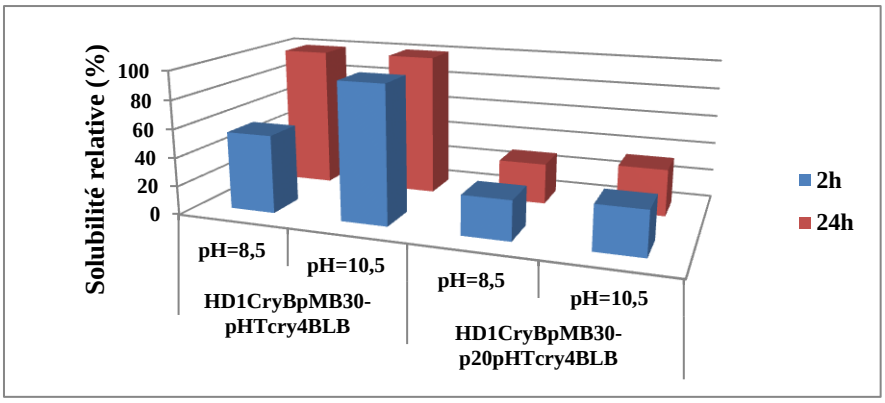


Figure 2: Comparaison de la solubilité relative des cristaux Cry4BLB produits par HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry4BLB* (en présence de P20) par rapport à ceux produits par HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry4BLB* (en absence de P20).

I-3- Effet de l'expression de P20 sur la production et la toxicité des δ-endotoxines Cry2Aa

Les toxines Cry2Aa, de 70 kDa, présentent une activité contre deux ordres d'insectes à savoir les Lépidoptères et les Diptères. Nous avons étudié l'effet de la protéine chaperonne P20 sur le pouvoir larvicide des δ-endotoxines Cry2Aa. Pour ce faire, nous avons étudié l'activité larvicide des transformants de HD1CryB exprimant Cry2Aa individuellement ou en combinaison avec P20 contre des larves de Lépidoptères d'*E. kuehniella* et de celles de Diptères d'*A. aegypti*.

> Etude de la toxicité contre des larves d'*E. kuehniella*

Nous avons étudié les activités insecticides des mélanges spores-cristaux produits par les transformants HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry2Aa* et HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry2Aa* contre des larves de stade L2 d'*E. kuehniella*. En effet, co-exprimée avec P20, la toxine Cry2Aa a présenté une CL_{50} 1,43 fois plus faible que le contrôle exprimant Cry2Aa seule contre *E. kuehniella* (Tableau 23). Ainsi, nous avons montré que la co-expression de Cry2Aa avec P20 a induit une amélioration de 43 % de son activité larvicide contre *E. kuehniella*.

Face à l'amélioration de l'activité larvicide des toxines Cry2Aa observée en présence de P20, et afin de chercher des éléments de réponse pouvant expliquer ces observations, nous nous sommes proposés d'investiguer une des plus importantes étapes de son mode d'action : L'activation. Pour comparer le comportement des protoxines Cry2Aa produites en présence ou en absence de P20 vis-à-vis des protéases intestinales des larves d'*E. kuehniella*, nous avons suivi leur digestion, au cours du temps, par les protéases larvaires d'*E. kuehniella.*

La visualisation des produits de protéolyse sur gel SDS-PAGE a montré certaines différences entre les toxines Cry2Aa, exprimées dans deux conditions différentes (en présence ou en absence de P20), du point de vue stabilité de la forme active responsable de l'activité larvicide de 65 kDa (Figure 3). Cependant, dans le cas des protéines Cry2Aa produites en présence de P20, la toxine active (de 65

kDa), s'est montrée assez stable vis-à-vis des protéases intestinales (**Figure 3**). Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un meilleur repliement qui induit une meilleure protection et une haute stabilité des toxines Cry2Aa, produites en présence de la protéine chaperonne P20, vis-à-vis des protéases larvaires d'*E. kuehniella* pouvant être à l'origine de l'amélioration de la toxicité observée.

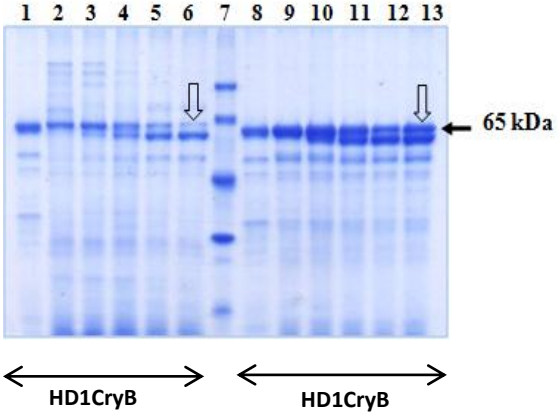


Figure 3: Suivie de la protéolyse *in vitro* des protoxines Cry2Aa produites par les transformants HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry2Aa* et HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry2Aa* en utilisant les protéases larvaires d'*E. kuehniella*.

Voies : 1- Non digéré ; 2- t =10 min ; 3- t =15 min ; 4- t =30 min ; 5- t =1 h ; 6- t =2 h ; 7- LMW (97 ; 66 ; 45 ;

>>Etude de la toxicité contre des larves d'*A. aegypti*

Dans le même contexte, nous avons comparé l'activité insecticide du mélange spores-cristaux de HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry2Aa* par rapport au contrôle HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry2Aa* contre des larves d'*A. aegypti*. Les résultats obtenus ont montré une amélioration spectaculaire de l'activité larvicide de Cry2Aa produites en présence de P20 contre *A. aegypti*. En effet la valeur de la CL_{50} du mélange spores-cristaux de HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry2Aa* est 354 fois plus faible que celle du mélange spores-cristaux de HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry2Aa*. Ainsi, la co-expression de Cry2Aa avec P20 a augmenté considérablement son efficacité contre des larves de Diptères d'*A. aegypti*.

De manière équivalente, nous avons supposé que l'amélioration spectaculaire de l'activité larvicide des toxines Cry2Aa produites en présence de la protéine chaperonne P20 contre des larves d'*A. aegypti* est la conséquence d'une meilleure résistance de la forme active contre la protéolyse poussée. Alors, l'étude de l'activation des δ-endotoxines Cry2Aa, produites en présence ou en absence de P20, par les protéases intestinales des larves d'*A. aegypti* a été menée. Les résultats obtenus ont montré que la forme active de la δ-endotoxine Cry2Aa, produite en présence de P20, est beaucoup plus stable vis à vis des protéases intestinales comparée avec le contrôle négatif (Cry2Aa produite en absence de P20) (**Figure 4**). En effet, cette forme active, qui a disparu très rapidement, dans le cas de Cry2Aa produite en absence de P20, a persisté même après 2 h d'incubation avec les protéases d'*A. aegypti* pour Cry2Aa produite en présence de P20. D'où la présence de la protéine chaperonne P20 semble avoir un impact sur la rigidité des toxines actives aboutissant à une protection contre l'inactivation à cause d'une protéolyse poussée.

II- Bioinsecticides actifs contre les lépidoptères :

II-1- Effet de l'expression de P20 sur l'activité larvicide des δ-endotoxines Cry1Ac de *B. thuringiensis kurstaki*

Les δ-endotoxines Cry1Ac présentent une activité larvicide contre une large gamme de Lépidoptères en particulier la pyrale de la farine *E. kuehniella*. Dans le but d'étudier l'effet de la protéine chaperonne P20 sur la toxicité de Cry1Ac, une étude comparative des activités insecticides des mélanges spores-cristaux produits par les transformants HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry1Ac* et HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry1Ac* a été réalisée contre des larves de Lépidoptères d'*E. kuehniella*.

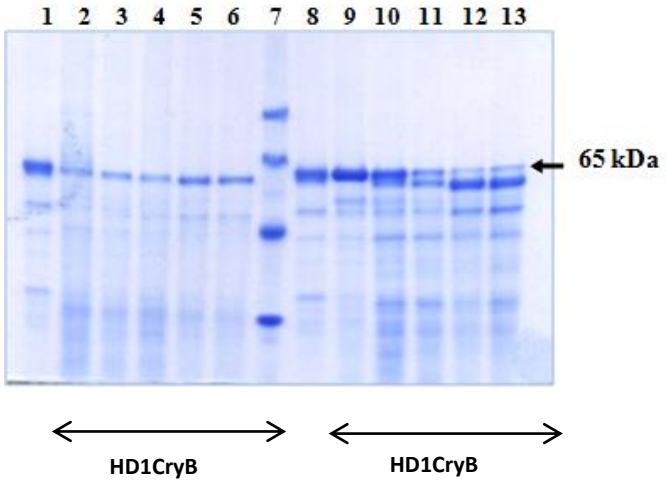


Figure 4: Suivie de la protéolyse *in vitro* des protoxines Cry2Aa produites par les transformants HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry2Aa* et HD1CryBpMB30*p20*-pHT*cry2Aa* en utilisant les protéases larvaires d'*A. aegypti*.

Voies : 1- Non digéré ; 2- t =10 min; 3- t =15 min ; 4- t =30 min ; 5- t =1 h ; 6- t =2 h ; 7- LMW (97 ; 66 ;

Le suivi de la mortalité des larves exposées aux δ-endotoxines Cry1Ac produites en présence de P20 a permis de mettre en évidence une importante amélioration de l'activité larvicide par rapport au contrôle (Cry1Ac produites en absence de P20). En effet, la co-expression de P20 avec Cry1Ac a amélioré le pouvoir larvicide de cette dernière d'un facteur de 2,59. L'amélioration de l'activité larvicide observée était probablement due à un meilleur repliement de Cry1Ac facilité par la protéine chaperonne P20 ce qui pourrait la protéger contre la dégradation et augmenter, par conséquent, son efficacité. En effet, nous avons étudié l'étape activation du mode d'action de ces δ-endotoxines. Après la solubilisation des cristaux produits par les souches HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry1Ac* et HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry1Ac*, nous avons suivi la protéolyse des δ-endotoxines Cry1Ac (produites en présence ou en absence de P20), *in vitro* et au cours du temps, par les protéases intestinales des larves d'*E. kuehniella* **(Figure 5)**.

L'analyse par SDS-PAGE des produits de digestion a montré que les toxines Cry1Ac co-exprimées avec P20 ont une meilleure stabilité vis à vis des protéases intestinales d'*E. kuehniella* (Figure 5). Ces résultats montrent bien l'existence de différences de sensibilité des toxines Cry1Ac, produites en présence ou en absence de P20, aux protéases larvaires d'*E. kuehniella*. Cette différence semble être due à une structure plus compacte des toxines Cry1Ac, produites en présence de la protéine chaperonne P20, et est donc moins accessible à la digestion poussée par les protéases.

Ceci pourrait être à l'origine de la différence de toxicité observée.

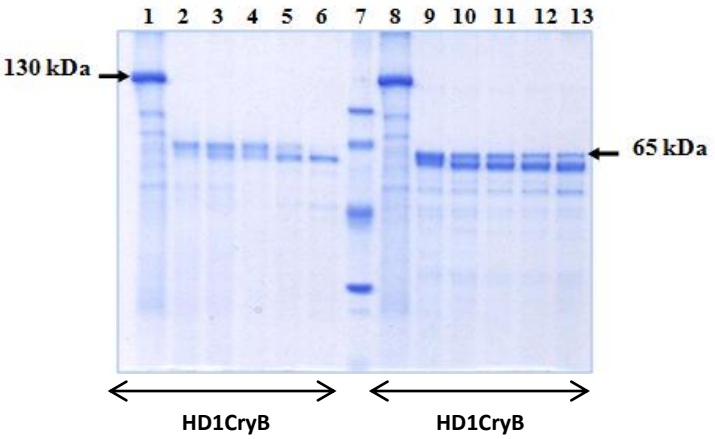


Figure 5: Suivie de la protéolyse *in vitro* des protoxines Cry1Ac produites par les transformants HD1CryBpMB$_{30}$-pHT*cry1Ac* et HD1CryBpMB$_{30}$*p20*-pHT*cry1Ac* en utilisant les protéases intestinale d'*E. kuehniella*.

Voies : 1- Non digéré ; 2- t =10 min ; 3- t =15 min ; 4- t =30 min ; 5- t=1 h ; 6- t =2 h ; 7- LMW (97 ; 66 ; 45 ; 30 ; 20,1 ; 14,4 kDa) ; 8- Non digéré ; 9- t =10 min ; 10- t =15 min ; 11- t =30 min ; 12- t =1 h ; 13- t =2 h.

II-2- Investigation biochimique des delta-endotoxines Cry2A de *Bacillus thuringiensis*

A partir de la collection des souches de *B. thuringiensis* disponibles dans le laboratoire de Protection et Amélioration des Plantes (équipe Biopesticides), six nouvelles souches, sélectionnées pour leur contenu en gènes *cry*2, ont fait l'objet d'une étude des profils protéiques de leurs toxines, de la caractérisation de ces toxines par western blot et de leur activation et inactivation par le jus larvaire d'*E. kuehniella*, la trypsine et la chymotrypsine.

L'étude des profils protéiques des toxines produites par ces six souches a montré des résultats en accord avec les observations microscopiques de leurs cristaux et leurs caractérisations moléculaires. L'utilisation d'anticorps anti-Cry2Aa, a confirmé l'expression de la toxine Cry2Aa uniquement chez BLB240 et MEB4 présentant le cristal cubique. La réactivité croisée de ces anticorps a permis de détecter la bande de 130 kDa caractéristique des toxines Cry1A chez ces souches et la souche BLB140.

Les profils de digestion protéiques par le jus larvaire d'*E. kuehniella* ont montré un retard d'activation complète de la toxine Cry2A qui résiste à l'inactivation au bout de 13h d'incubation (Figure 6). Cette activation est fort probablement de type trypsine-like. Les résultats de la protéolyse par la chymotrypsine confirment d'une part, que le site de clivage du fragment de 49kDa est spécifique de cette protéase et suggèrent d'autre part, que les modifications des paramètres physicochimiques au niveau de Cry2A de MEB4 n'empêchent pas la libération de ce fragment par la chymotrypsine, mais retardent son apparition. Le test de toxicité de la souche recombinante ELB508 qui exprime le gène *cry2*Aa de MEB4 a été donc réalisé pour évaluer l'impact de ces modifications sur l'activité de cette toxine. Les résultats ont montré une forte toxicité contre les larves d'*E. kuehniella* comparé à la souche recombinante exprimant le gène *cry2*Aa de la souche BNS3, utilisée comme contrôle (Tableau 1).

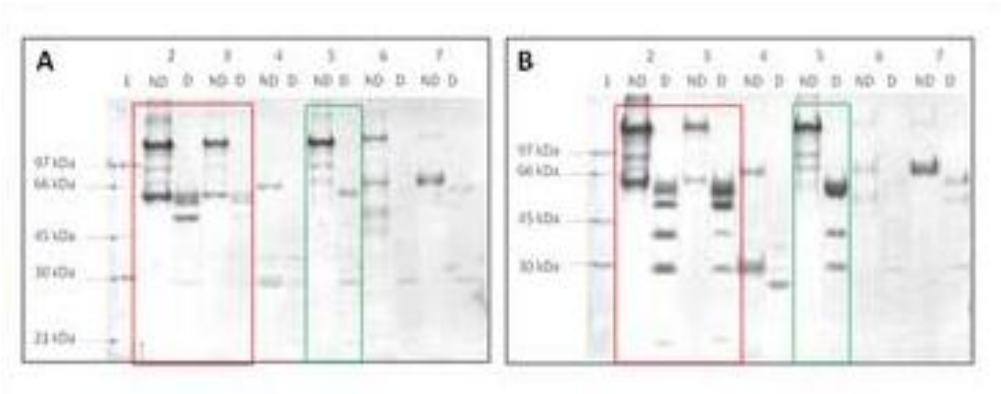


Figure 6 : Analyse SDS-PAGE des produits de digestion des protéines Cry2Aa des six souches par la chymotrypsine au stade L1 après des périodes d'incubation de 1h (A) et 13h (B) respectivement. ND : non digéré ; D : digéré. 1 : Marqueur de taille ; 2 : BLB240 ; 3 : MEB4 ; 4 : BLB200 ; 5 : BLB140 ; 6 : BLB30 ; 7: BUPM109.

Tableau 1: toxicité de la souche ELB508 de *B. thuringiensis* contre *E. kuehniella.*

SOUCHE	CL50 (MG/G DE SEMOULE)	CL90 (MG/G DE SEMOULE)
BNS3-CRY2A	**802,6 ± 612**	**2486,7 ± 734**
MEB4-CRY2A	**145,35 ± 106,2**	**676,08 ± 168,4**

II-3- Investigation moléculaire des delta-endotoxines Cry2A de *Bacillus thuringiensis*

La comparaison par le programme BLAST de la séquence complète du gène *cry2Aa* de la souche MEB4 avec celui de BNS3 a montré un pourcentage d'identité de 98%. 15 changements d'acides aminés ont été détectés au niveau de la séquence protéique de *cry*2Aa. La superposition des 2 structures n'a pas montré de changements significatifs. Seul l'index d'hydropathie a changé suggérant une protéine plus hydrophile. L'étude des changements au niveau des acides aminés entre Cry2Aa de BNS3 et Cry2Aa de MEB4 a révélé une modification au niveau de la position 139, remplaçant une glutamine par une arginine (**Figure 7**). Cette modification a fait apparaitre un nouveau site de clivage par la trypsine pouvant avoir un impact sur l'activité de la toxine.

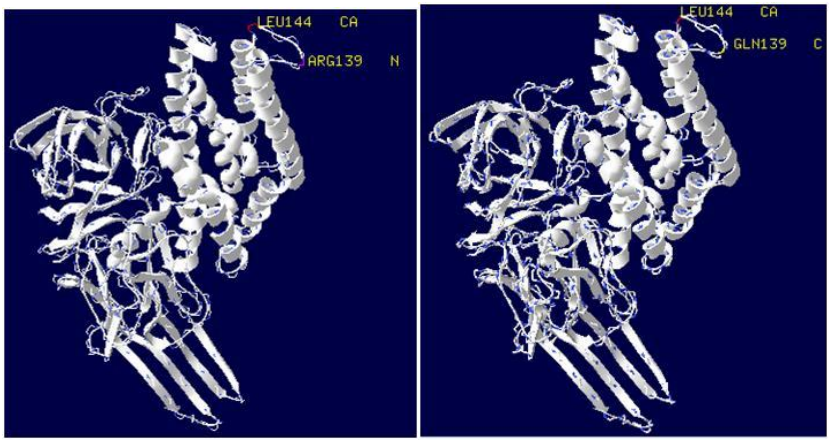


Figure 7 : Localisation de l'acide aminé 139 au niveau des structures tridimensionnelles de Cry2Aa-MEB4 et Cry2Aa-BNS3

II-4- Amélioration des potentialités des souches de *B. thuringiensis* par mutagenèse

Le traitement des cellules végétatives de la souche sauvage BUPM28 par l'acide nitreux a conduit à l'isolement de 110 mutants. L'observation microscopique a montré la présence des spores et des cristaux de forme bipyramidale et cubique chez tous les mutants obtenus. La morphologie des cristaux des mutants est similaire à celle de la souche sauvage. Par conséquent, le traitement mutagène n'a pas altéré la capacité des cellules à produire des spores et de protéines cristallines qui sont responsables de l'activité insecticide.

Nous avons évalué la production en δ-endotoxines de 30 mutants en utilisant un milieu complexe à base d'amidon et de tourteaux de soja à l'échelle d'erlenmeyer de 1 litre afin de sélectionner les mutants ayant une forte capacité à produire les δ-endotoxines. Nous avons sélectionné 3 mutants (M29, M12 et M20) qui ont une production de δ-endotoxines (3827, 3812 et 3698 mg/l, respectivement) supérieure à celle de la souche sauvage BUPM28 (3150 mg/l). Ces 3 mutants hyperproducteurs présentent une amélioration de la production qui varie de 17 à 21 %.

Afin d'élucider l'impact des mutations aléatoires sur les voies métaboliques des cellules de *B. thuringiensis*, les CFU ont été comptées et les rendements de synthèse de δ-endotoxines de production ont été calculés. Les mutants hyperproducteurs M29 et M20 (93,36 et 89,49 mg/10^{10} spores, respectivement) présentent les rendements en δ-endotoxines les plus importants par rapport aux autres mutants criblés et par rapport à la souche sauvage BUPM28 (76,96 mg / 10^{10} spores). Toutefois, le rendement en δ-endotoxines du mutant hyperproducteur M12 (61 mg / 10^{10} spores) est significativement inférieur à celui de la souche sauvage. L'amélioration de la production de δ-endotoxines par les mutants M29 et M20 pourrait être attribuée à l'amélioration de l'expression des gènes *cry* et / ou à l'augmentation de la production par les cellules sporulées. Par ailleurs, l'amélioration de la production de δ-endotoxines par le mutant M12 pourrait être due à l'accroissement du nombre de spores formées par ce mutant.

II-5- Mise au point de nouveaux milieux de cultures économiques pour la production de bioinsecticides à bases de boues d'épurations

Dans le cadre de la réduction du coût de production de bioinsecticides, nous avons opté à l'utilisation des boues d'épuration comme un substrat de fermentation de la souche BLB1 de *Bacillus thuringiensis*, représentant ainsi une approche éco-respectueuse de l'environnement et économique pour

la gestion des déchets. Des boues de différents types et origines ont été utilisées comme substrat de fermentation, à savoir les boues primaires (BI), les boues mixtes (Bm), les boues secondaires (BIIS1 et BIIS2).

La caractérisation chimique des quatre types de boues utilisées a montré qu'elles contiennent des éléments pouvant soutenir la croissance de ces bactéries. Entre eux se trouve le carbone, l'azote, les éléments minéraux comme le calcium et le magnésium, ainsi que divers ions métalliques qui sont nécessaires pour le développement de ces bactéries.

Nous avons montré que l'utilisation des boues secondaires (BIIS1) comme substrat de fermentation pour la culture de *B. thuringiensis* constitue un milieu efficace pour la croissance de cette bactérie en produisant des concentrations de cellules, de spores et de δ-endotoxines de l'ordre de 6×10^8cellules/ml, $5{,}8\times10^8$ spore/ml et 700 µg/ml, respectivement. De plus, nous avons démontré que la préparation de la préculture dans le même substrat que le milieu de production final de *B. thuringiensis* (Boue secondaire : BIIS1) permet non seulement d'améliorer la croissance et l'entomotoxicité de souche BLB1 mais également de réduire la phase de latence et d'augmenter le taux de croissance spécifique.

Dans le même ordre d'idées, il a été clairement constaté au cours de ce travail que le pourcentage d'inoculation initial est un facteur déterminant dans la production de *B. thuringiensis* et qu'un taux de 2% permet d'obtenir une amélioration de la croissance de ce micro-organisme entompathogène qui devient de l'ordre de 11×10^8cellules/ml et 10×10^8spore/ml ainsi que pour la production de δ-endotoxines qui atteint 930 µg/ml.

II-6- Mise au point de nouvelles formulations de bioinsecticides à bases de boues d'épurations

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons utilisé les boues d'épuration pour la formulation des biopesticides à base de *B. thuringiensis*. Après 6 mois de conservation, nous avons montré que les boues liquides BI, BIIS1, BIIS2 pourraient jouer le même rôle des adjuvants utilisés dans la formulation des biopesticides et parviennent dans le maintien de la stabilité des δ-endotoxines en empêchant leurs dégradations accélérées au cours du stockage à température ambiante et à la lumière. De plus, nous avons montré que les boues secondaires (BIIS1) offrent une protection naturelle contre les rayonnements solaires lorsqu'elles sont utilisées comme milieu de production, contrairement au milieu conventionnel à base de tourteau de soja ce qui représente un atout économique considérable.

II-7- Valorisation d'un biopesticide de *Bacillus thuringiensis* : du laboratoire à la commercialisation (Thèse mobidoc).

La recherche appliquée, au sein du laboratoire de Protection et Amélioration des Plantes, a focalisé d'une part sur la production par fermentation des biopesticides et le scale-up, d'autre part, sur la mise au point de nouvelles générations de biopesticides, et enfin le suivi des activités insecticides des toxines de *B. thuringiensis* au Laboratoire et en plein champ sur les ravageurs de l'oliveraie et de la tomate. Malgré l'acquisition par notre laboratoire d'une expertise et d'un savoir-faire dans le domaine du développement de biopesticides, un gap dans la chaîne de la valorisation, faisant le lien entre la recherche et la commercialisation d'un biopesticide a été le principal handicap pour l'exploitation industrielle de ces compétences. En effet, les résultats des recherches issues de laboratoires doivent

passer par une phase de développement afin de rencontrer les exigences du secteur privé. Le dernier maillon de la chaine de valorisation de ces produits, à savoir la maturation de l'innovation jusqu'à sa commercialisation a été amorcé par l'instauration d'un partenariat stratégique avec un leader tunisien en industrie pharmaceutique, intéressé par la santé végétale, pour le transfert de technologie de production des biopesticides et leur commercialisation. Cette collaboration s'est manifestée par une thèse mobidoc pour le développement d'un traitement des agrumes. Nous avons donc, pu mettre au point et en marche tout le processus complet de la fabrication d'un biopesticide. À partir d'une souche de laboratoire de *B. thuringiensis* hyper productrice (BLB1), nous avons produit des grandes quantités des delta-endotoxines (principe actif) par des fermentations successives. Après récupération et formulation des toxines produites, nous avons appliqué le produit final sur le champ pour tester l'efficacité de notre produit. De plus, nous avons commencé les expériences de Scale up en étudiant le bilan de la matière pour deux milieux de production. A ce stade, nous avons testé deux modes de fermentations (Batch simple et Fed-Batch) à l'échelle erlenmeyer et en focalisant en 1ér lieu sur l'étude de bilan de la matière d'un milieu simple de production à base de glucose. Le dosage des protéines par la méthode de Bradford nous a permis de suivre la production des delta-endotoxines au cours du temps. Aussi, nous avons procédé à la lyophilisation de la biomasse de la souche, des différentes conditions de culture, afin de déterminer les constantes de croissance et la cinétique de BLB1.

Partie B : Etude et Production des bioinsecticides à base de protéines Vip (Vegetative Insecticidal Proteins) de *Bacillus thuringiensis*

1- Optimisation de la production de la toxine Vip3Aa16 de *B. thuringiensis* BUPM95 :

Dans des travaux antérieurs, nous avons cloné le gène *vip3Aa16* de *B. thuringiensis* BUPM95 dans le vecteur d'expression pBAD en vue d'une expression hétérologue de la protéine correspondante dans *E. coli*. Après la réussite du clonage et la vérification de l'expression de la toxine Vip3Aa16, nous avons essayé d'améliorer sa production moyennant un plan de criblage de différents facteurs. Cette étude a montré que les facteurs les plus influant sur la production de la Vip3Aa16sont température après induction et le temps après induction (**Fig. 1**).

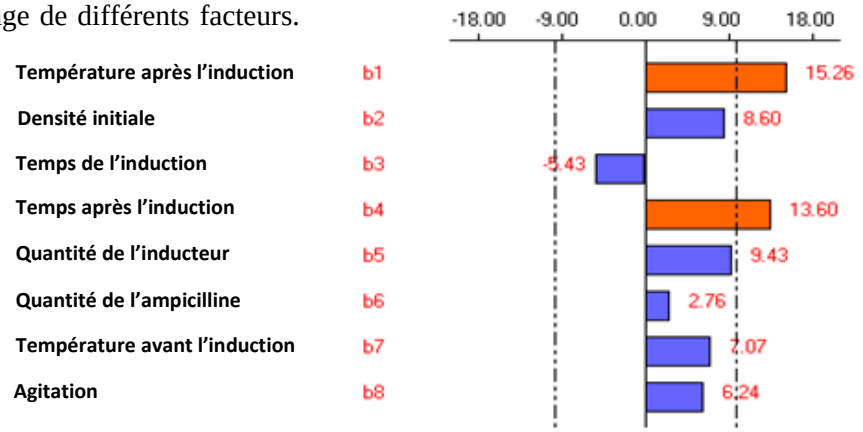
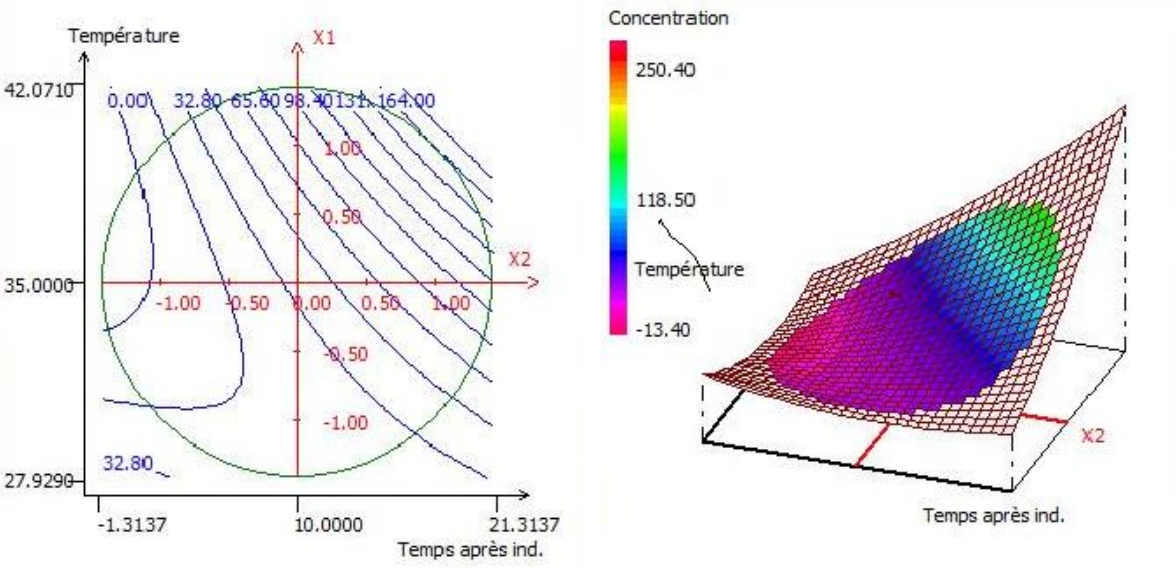


Figure 1 : Etude graphique de l'effet de différentes variables opérationnelles sur la production de la toxine Vip3Aa16

Les deux paramètres identifiés comme ayant un effet significatif sur la production de la toxine Vip3Aa16 par le plan de criblage ont été étudiés en utilisant un plan composite afin d'identifier leurs concentrations optimales et afin d'améliorer la production de la souche

étudiée. Les valeurs des autres paramètres ont été fixées au centre des intervalles étudiés. L'examen des courbes d'isoréponses ***(Fig. 2)*** *montre que la production maximale de la toxine Vip3Aa16 est obtenue pour une température variant de 38,5 à 41°C et un temps après induction variant de 16 à 19 h. En se basant sur l'analyse de ces résultats, 2 optimums de production ont été choisis et leurs valeurs prédites ont été vérifiées expérimentalement par des cultures réalisées en duplicata.*



Etude graphique en 2 D *Etude graphique en 3 D*

Figure 2 : Variation de la production de Vip3Aa16 en fonction de la température et du temps après induction

En se basant sur les résultats obtenus, les conditions optimales de la surproduction de Vip3Aa16 sont : température avant induction (35°C), température après induction (39°C), densité cellulaire initiale (0,055), quantité de l'inducteur (0,2 mg/ml), temps de l'induction (3,5 h), temps après induction (18 h), quantité de l'ampicilline (100 µg/ml) et agitation (200 rpm). Sous ces conditions expérimentales, la concentration de Vip3Aa16 produite est de 170 µg/ml. Il s'agit d'une valeur améliorée d'environ 21 fois par rapport à celle obtenue avec les conditions de production sans optimisation (8 µg/ml). Ceci aura un important impact dans une lutte économique contre les insectes phytopathogènes. En effet, suite à cette amélioration du taux de production, nous pouvons utiliser directement le surnageant après sonication sans avoir recours à des étapes de purification supplémentaires qui visaient la concentration de l'agent toxique (Vip3Aa16). Ainsi et par l'optimisation des conditions de culture, nous pouvons réduire le coût de production de cette toxine.

2- Amélioration de la production de VipAa16 par mutagenèse classique :

Naturellement, le métabolite bactérien est soigneusement contrôlé afin d'éviter les pertes d'énergie et l'accumulation d'intermédiaires métaboliques. Afin d'améliorer la production de certains métabolites, la

mutagenèse classique s'est montrée un moyen très prometteur que ce soit par voie chimique ou physique. Dans ce cadre, nous avons utilisé la souche sauvage BUPM95 *de B. thuringiensis* et nous avons essayé d'améliorer la production et/ou l'activité insecticide des toxines Vip3 et ceci par l'acide nitreux et les rayons UV comme agents mutagènes. Ces deux agents présentent un effet relatif moyen de mutagenèse permettant d'obtenir une bonne fréquence de survivants avec le maximum d'effets mutagènes (Parekh et coll., 2000).

Suite à l'action de ces 2 agents, nous avons obtenu un grand nombre de mutants de *B. thuringiensis* ayant un taux d'amélioration de la production des toxines Vip3 dépassant les 70%.

Dans le but d'estimer l'effet toxique du surnagent de culture des mutants de *B. thuringiensis* sur le ravageur polyphage *Spodoptera littoralis*, nous avons fait des tests sur des larves au stade L1 et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Pourcentage de mortalité (*S. littoralis*) pour 100 µl de surnageant de culture de *B. thuringiensis*

Souche	**Pourcentage de toxicité pour 100 µl de surnageant (%)**
Curée	0
Sauvage	75
M_{73} traité pendant 15' avec l'Acide Nitreux	83,33
M_{62} traité pendant 45' avec l'Acide Nitreux	91,66
M_{26} traité pendant 60' avec l'UV	100
M_{43} traité pendant 60' avec l'UV	91,66
M_{76} traité pendant 60' avec l'UV	83,33

D'après ces résultats, nous avons conclu que l'activité insecticide a été améliorée pour les souches mutées par comparaison à la souche sauvage. Ceci montre bien que la quantité de Vip3Aa16 produite par volume de surnageant a été améliorée. Une autre hypothèse pourrait s'ajouter à ce résultat, c'est que la protéine Vip3Aa16 pourrait aussi être améliorée dans ses capacités insecticides suite à l'action des agents mutagènes.

3- Etude de l'effet de la toxine Vip3Aa16 sur la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* :

Dans le cadre de la détermination du spectre d'action de la protéine Vip3Aa16 sur les Lépidoptères et sachant que cette toxine est active sur *P. oleae*, *S. littoralis* et *E. kuehniella*, nous avons cherché à étudier son activité sur le lépidoptère *Ectomyelois ceratoniae*. En effet, l'étude de la toxicité sur les larves (stade L1) de cet insecte a été réalisée en utilisant différentes concentrations de la toxine Vip3Aa16 contenue dans le surnageant après sonication des cellules d'*E. coli* préparées après optimisation des conditions de production. En parallèle avec cette expérience, nous avons réalisé un test

témoin avec le surnageant de culture d'*E. coli* n'exprimant pas la protéine Vip3Aa16. Les résultats obtenus montrent que Vip3Aa16 est active contre *E. ceratoniae* avec des une CL_{50} de l'ordre de 40 ng/cm^2.

L'étude de l'effet histopathologique de Vip3Aa16 sur les larves de la pyrale des dattes a montré que cette toxine agit sur l'intestin larvaire en détruisant les cellules épithéliales (Fig. 3B) aboutissant finalement à la mort de la cible.

4-Etudes d'activités insecticides de *Bacillus thuringiensis* contre les ravageurs *Tuta absoluta* et *Thysanoplusia orichalcea*

Nous avons comparé les activités entomopathogènes Vip3 "Vegetative Insecticidal Protein" à celles des delta-endotoxines Cry1 et Cry2 contre les larves des lépidoptères *T. absoluta* et *T. orichalcea*.

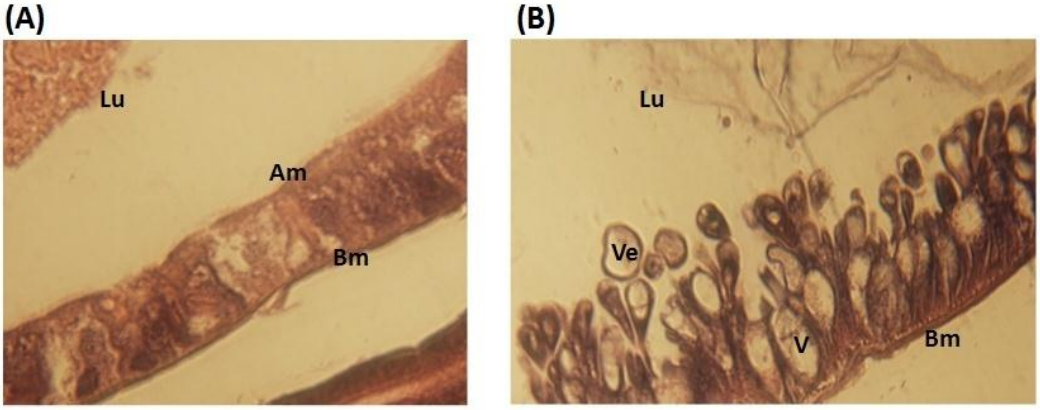


Figure 3 : Effet histopathologique des toxines Vip3Aa16 sur les larves du lépidoptère *Ectomyelois ceratoniae*

(A) Aspect des cellules intestinales sans la toxine Vip3Aa16, (B) Effet causé par la toxine Vip3Aa16 avec une forte vacuolisation (V), formation de vésicules (Ve) et destruction des cellules épithéliales intestinales.

En premier lieu, nous avons montré que le jus intestinal de la larve *Tuta absoluta* contient au minimum 5 activités protéasiques qui sont impliquées dans la protéolyse des delta-endotoxines et des protéines Vip3A1-4. Nous avons aussi montré que la protéine Vip3A1-4 sera protéolysée sous l'effet des protéases du jus larvaire au bout de 120 minutes d'incubation où la forme de protéolyse de 65 kDa sera détectée. Lorsqu'elle est incubée en présence de la chymotrypsine, la protéine Vip3A1-4 est rapidement dégradée en 65 kDa, alors qu'en présence de la trypsine, la forme entière ne disparait qu'après 45 min démontrant que le jus larvaire de *T. absolua* pourrait être beaucoup plus riche en trypsine. Dans un autre volet, nous avons prouvé que les protéines Vip3A1-4 interagissent avec les BBMV de *T. absolua* et que la concentration létale 50% (CL50) était d'environ 335 + 17 ng/cm^2.

D'autre part, nous avons comparé les effets des δ-endotoxines Cry1Ac, Cry1Aa, Cry2 ainsi à celui de Vip3Aa16 de *B. thuringiensis* sur le ravageur *T. orichalcea*. Nous avons démontré que Cry1Ac est la protéine la plus toxique, suivie par Cry1Aa, Vip3Aa16 et Cry2. Toutefois, l'examen des profils de protéolyse des trois protéines Cry1Ac, Cry1Aa et Vip3Aa16 par le jus intestinal larvaire (contenant au

moins 5 activités protéasiques), la trypsine et la chymotrypsine a révélé que l'activation de Cry1Ac et Vip3Aa16 produit la forme active de 65 kDa qui reste relativement stable. Par contre, l'activation de Cry1Aa produit peu de forme active de 65 kDa et donne des produits de protéolyse de plus faibles poids moléculaires. La protéolyse excessive de Cry1Aa serait responsable de sa faible activité insecticide par comparaison avec Cry1Ac. En revanche, la stabilité de la forme active (65 kDa) de Vip3Aa16 n'explique pas sa faible activité insecticide contre *T. orichalcea* surtout que les protéines de type Vip3 sont généralement plus toxiques que les δ-endotoxines. Cette faible activité insecticide de Vip3Aa16 pourrait être liée à l'interaction de Vip3Aa16 activée avec ses récepteurs spécifiques intestinaux.

Partie C : Les bioinsecticides d'origine végétale

Notre étude a été menée pour explorer les potentialités insecticides de deux plantes *Emex spinosa* et *Scolymus hispanicus* pour une éventuelle utilisation dans la lutte biologique contre *Ephestia kuehniella* et *Spodoptera littoralis.* Les CL50 montrent que, contre *E. kuehniella*, les extraits hexanique et hydro-alcoolique d'*E. spinosa* exercent une activité modérée qui de l'ordre de 3.4 mg/g de nourriture. Tandis que l'extrait hexanique de *S. hispanicus* a une CL50 de l'ordre de 3.9mg/g de nourriture. Contre *S. littoralis*, l'activité la plus intéressante est observée avec l'extrait hydro-alcoolique des deux plantes avec des CL50 de l'ordre de 0.36 et 0.73 mg/g de nourriture pour *E. spinosa* et *S. hispanicus* respectivement.

D'autre part, l'activité insecticide contre *Spodoptera littoralis* des différents extraits d'une troisième plante, *Eucalyptus cinerae*, a décelé que les huiles essentielles des cônes et des feuilles et l'extrait hexanique s'avèrent les plus actifs avec des CL_{50} de l'ordre de 1.32 ±0 .46, 2.01± 0.33 et 0.93± 0.16 mg/g de nourriture, respectivement.

PROJET 2 : LES BIOFONGICIDES D'ORIGINES MICROBIENNE ET VEGETALE

Dans ce 2ème projet, nous nous intéressons à la mise au point de différents types de fongicides biologiques. Différentes sources de ces biomolécules ont été exploitées, allant de Bacillus spp., à Pseudomonas, à Agrobacterium radiobacter, à des extraits de plantes ou encore à des macroalgues marines valorisables.

I- Sélection de souches bactériennes dotées d'activités anti-fongiques

L'exploitation des micro-organismes s'avère de plus en plus utile dans différents domaines de recherche principalement la biotechnologie et la bio-industrie. Dans ce cadre, le pouvoir antifongique d'une collection de souches isolées de différentes matrices (jus de compost, sol, endophytique…) a été étudié. Des souches bactériennes morphologiquement différentes ont été isolées et une série de tests d'antagonisme vis-à-vis de champignons phytopathogénes *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus flavus* a été effectuée moyennant trois modes opératoires différents. Les résultats ont montré la pertinence de cinq souches qui inhibent le développement *in vitro* d'une large gamme de champignons dont *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporium*. En vue de déterminer l'identité de ses souches, des méthodes d'analyses biochimiques et moléculaires ont été adoptées. L'observation microscopique, la coloration de Gram et les galeries API 20 E et API 50 CHB ont été utilisées pour l'identification morphologique et biochimique. En associant les méthodes biochimiques aux outils moléculaires, amplification de l'ADNr 16S en utilisant les amorces universelles Rd1 et Fd1, des séquences de l'ordre de 1,5 kb de longueur ont été obtenues et analyées. Les souches identifiées

appartiennent au genre de *Bacillus* à savoir *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis*. L'activité antifongique de ses bactérie est attribuable à la production d'importants lipopeptides qui ont été isolés et identifiés comme des fengycines, surfactines, utérines et d'autres métabolites secondaires en cours de séparation et identification structurale moyennant les méthodes spectroscopique RMN, IR, LC/MS-MS.

II- Amélioration de l'activité antifongique d'une souche de *Bacillus amyloliquefaciens* par mutagenèse classique

Nous nous sommes intéressés à l'amélioration de l'activité antifongique de *Bacillus amyloliquefaciens* par mutagenèse classique pour la surproduction des biofongicides. Nous avons appliqué trois tours de mutagenèse classique à l'aide de l'acide nitreux. A chaque tour de mutagenèse, nous avons choisi la souche la plus active et la plus stable pour effectuer sur sa base un nouvel tour de mutagenèse. Les trois tours successives de mutagenèse nous ont permis de mettre au point une nouvelle génération de mutants dont l'aspect de la colonie est modifié par rapport à celui de la souche mère. La comparaison de l'activité antifongique des différents mutants obtenus et de la souche sauvage nous ont permis de sélectionner un mutant très actif et dont l'activité est stable (M3-7PC). Son activité antifongique est de l'ordre de 1850 UA/ml et elle est 640 % plus importante que celle de la souche sauvage. La comparaison de l'identité de la souche sauvage et du mutant le plus amélioré par une identification moléculaire et une identification par la galerie API, a prouvé que les deux souches appartiennent à l'espèce de *Bacillus amyloliquefaciens*. Par ailleurs, nous avons réussi à surproduire la production des substances antifongiques de ce mutant jusqu'à 12 fois par rapport à la souche de base en optimisant les conditions du milieu de culture par un plan d'expériences. L'analyse chimique par LC/MSMS a montré la synthèse de nouvelles molécules à activité antifongique. Cette démarche permettra une lutte plus efficace contre les champignons phytopathogènes et la réduction du coût de production des biofongicides. La production et la formulation des métabolites de ses bactéries et leurs applications *in vivo* est en cours.

III- Protection de la tomate contre *Botrytis cinera*

Le but de cette partie du travail est d'optimiser la co-production de différents métabolites antifongiques (lipopeptides, chitosanase, ..) produits par la souche V26 de *Bacillus subtilis* en vue de l'appliquer pour la protection de la tomate contre l'agent causal de la maladie de la pourriture des fruits de tomate, *Botrytis cinera*. Parmi les différents milieux de culture testés, le milieu M13 a montré simultanément de fortes activités antifongiques et chitosanase. Ainsi, la composition de ce milieu a été optimisée en utilisant la méthodologie de plans d'expériences, Box Behken. En utilisant le milieu optimisé, une amélioration de 93% dans la production de biofongicides a été obtenue en comparaison avec le milieu de base. Le surnageant de culture de V26, utilisé à 9%, a fortement inhibé la croissance de *B. cinerea* a à faible pourcentage (9%), et a provoqué divers changements morphologiques du mycélium. Le traitement des fruits de tomate par V26 a réduit de manière significative la pourriture causée par *B. cinerea*. Ces résultats montrent que la souche V26 de *B. subtilis* pourrait être utilisée en tant qu'agent biologique pour la protection de la tomate contre les maladies post-récolte.

PROJET 3 : LES BACTERICIDES D'ORIGINES MICROBIENNE ET VEGETALE

1- Les bactéricides d'origine microbienne : les antibiotiques de *Bacillus sp.*

Dans un travail antérieur, nous avons montré que la souche 32a de *Bacillus amyloliquefaciens* produit différents types de lipopeptides responsables de l'activité antibactérienne contre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58 et B6), agent responsable de la galle du collet. Au cours de cette année, nous nous sommes proposés d'investiguer le(s) mode(s) d'action utilisé(s) par la souche 32a pour la lutte contre les souches phytopathogènes d'*A. tumefaciens*.

La capacité des lipopeptides, présents dans l'extrait de la souche 32a, à protéger les plantes de tomates contre la maladie de la galle du collet causée par les souches d'*Agrobacterium* a été étudiée. Une protection totale a été observée. La détermination de la population du pathogène au niveau du site de l'infection a montré qu'elle diminue significativement au cours du temps alors que celle du témoin positif continue à augmenter (**figure 1**).

Dans un autre volet, la capacité des lipopeptides à inhiber la formation du biofilm bactérien d'*Agrobacterium* a été évaluée. Une diminution du nombre de cellules adhérentes au niveau des racines des plantes de tomate a été observée. Ces résultats montrent que la souche 32a, à travers les lipopeptides produits, agit sur les pathogènes d'*A. tumefaciens* non seulement par antibiose mais aussi par inhibition et dispersion de leurs biofilms formés sur les racines de plantes.

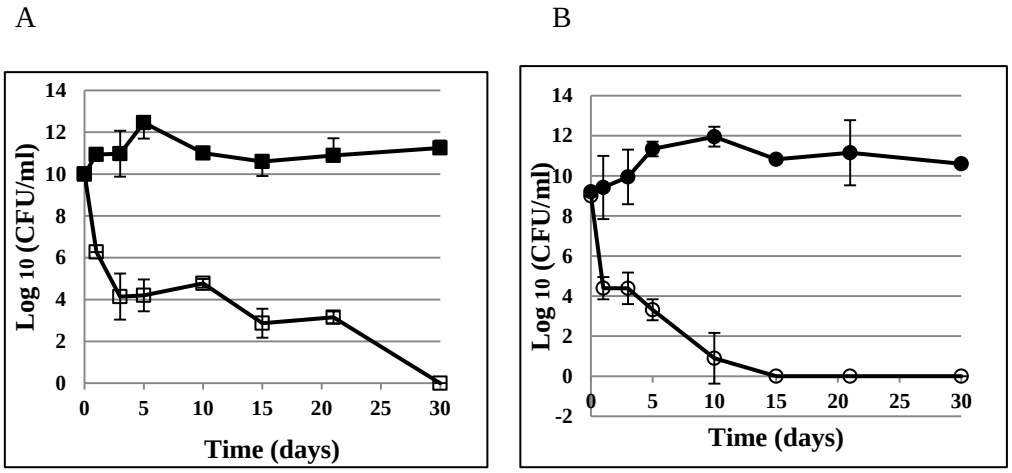


Figure 1: Dénombrement de la population pathogène en présence (○) et en absence (●) de l'extrait riche en lipopeptides. A : souche d'*A. tumefaciens* C58, B : souche d'*A. tumefaciens* B6.

2- Les biomolécules antibactériennes d'origine végétale

L'étude des activités antimicrobiennes d'*Emex spinosa* et de *Scolymus hispanicus* contre des souches phytopathogènes a révélé que l'extrait à l'acétate d'éthyle d'*Emex spinosa* est très efficace contre les souches microbiennes testées notamment contre *Agrobacterium tumefaciens B6*. Les essais *in vivo* réalisées en pots en utilisant avec l'extrait à l'acétate d'éthyle, effectuées sur la galle du collet de la tomate, ont permis de montrer que les parties aériennes de cette plante pourraient être utiliser comme un agent de lutte biologique contre ce phytopathogène. Pour mieux valoriser ces résultats, nous envisageons d'appliquer notre extrait sur l'amandier amer ; puisque ce dernier est le plus sensible contre *Ag tumefaciens*.

PUBLICATIONS INTERNATIONALES (2014)

1-Feki K., Quintero Fj., Khoudi H., Leidi OE., Masmoudi K., Pardo JM., Brini F. A constitutively active form of a durum wheat Na^+/H^+ antiporter SOS1 confers high salt tolerance to transgenic Arabidopsis. Plant Cell Report. 2014, 33 : 277-288

2-Belgaroui N., Zaidi I., Farhat A., Chouayekh H., Bouain N., Chay S., Curie C., Mari S., Masmoudi K., Davidian J-C., Berthomieu P., Rouached H. and **Hanin M.** Overexpression of the bacterial phytase US417 in *Arabidopsis* reduces the concentration of phytic acid and reveals its involvement in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signalling. Plant & Cell Physiology 2014, 55:1912-524.

3-Ghorbel M., Zaidi I., Robe E., Ranty B., Mazars C., Galaud J-P., and Hanin M. The activity of the wheat MAP kinase phosphatase 1 is regulated by manganese and by calmodulin. Biochimie, 2014, http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi. 2014.10.021, vol 108, 13-19.

4- Feki K, Brini F, Ben Amar S, Saibi W, Masmoudi K. Comparative functional analysis of two wheat Na^+/H^+ antiporter SOS1 promoters in Arabidopsis thaliana under various stress conditions. J. Appl.Genetics DOI 10.1007/s/13353-014-0228-7.

5-Ayadi M, Mieulet D, Fabre D, Verdeil JL, Vernet A, Guiderdoni E, Masmoudi K. Functional analysis of durum wheat gene TdPIP2 ;1 and its promoter region in response to abiotic stress in rice. Plant Physiology and Biochemistry 79 (2014) 98-108.

6- Amara I, Zaidi I, Masmoudi K, Ludevid D, Pagès M, Goday A, Brini F. Insights into Late Embryogenesis Abundant (LEA) Proteins in Plants : From Structure to the Functions. American Journal of Plant Science, 2014, 5, 3440-3455

7- Ben Hmad I, Abdeljalil S, Saibi W, Amouri B, Gargouri A. Medium initial pH carbon source stimulate differential alkaline cellulase time course production in *Stachybotrys microspora.* App. Biochem Biotechnol (2014) 172 : 2640-2649.

8- Abdeljalil S, Saibi W, Ben Hmad I, Baklouti A, Ben Mahmoud F, Belghith H, Gargouri A. Improvement of cellulase and xylanase production by solid state fermentation of *Stachybotrys microspora*. Biotechnology and Applied Biochemistry (2014) 1-9.

9- Ines Ben Fguira, Zaineb Fourati, Fakher Kamoun, Slim Tounsi and Samir Jaoua (2014) Isolation of the Bacillus thuringiensis plasmid carrying Bacthuricin F4 coding genes and evidence of its conjugative transfer. J Infect Dev Ctries 2014; 8:727-732.

10- Wafa Jallouli, Sameh Sellami, Maissa Sellami and Slim Tounsi (2014) Efficacy of olive mill wastewater for protecting *Bacillus thuringiensis* formulation from UV radiations. Acta Tropica 140 : 19–25.

11- Wafa Jallouli, Sameh Sellami, Maissa Sellami and Slim Tounsi (2014) Impact of liquid formulation based on ultrafiltration – recovered bioactive components on toxicity of Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki strain BLB1 against Ephestia kuehniella.

12- Jihen Elleuch, Raida Zribi Zghal, Mohamed Jemaà, Hichem Azzouz, Slim Tounsi, Samir Jaoua (2014) New *Bacillus thuringiensis* toxin combinations for biological control oflepidopteran larvae. International Journal of Biological Macromolecules 65: 148–154.

13- Jihen Elleuch, Slim Tounsi, Najeh Belguith Ben Hassen, Marie Noël Lacoix, Fabrice Chandre, Samir Jaoua, Raida Zribi Zghal (2014) Characterisation of novel Bacillus thuringiensis isolates against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) and Ceratitis capitata (Diptera: Tephridae)

14- Sameh Sellami , Maroua Cherif , Lobna Abdelkefi-Mesrati, Slim Tounsi, Kaïs Jamoussi (2014) Toxicity, Activation Process, and Histopathological Effect of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3Aa16 on *Tuta absoluta*. Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-014-1393-1.

15- Hichem Azzouz, Jihene Kebaili-Ghribi, Dalel ben Farhat-Touzri, Fatma Daoud, Ines Fakhfakh, Slim Tounsia and Samir Jaouab (2014) Selection and characterisation of an HD1-like *Bacillus thuringiensis* isolate with a high insecticidal activity against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag Sci 70: 1192–1201

16- Saoussen Ben Khedher, Samir Jaoua, and Nabil Zouari (2014) Overcome of Carbon Catabolite Repression of Bioinsecticides Production by Sporeless *Bacillus thuringiensis* through Adequate Fermentation Technology. Biotechnology Research International. Article ID 698587, 8 pages.

17- Azzouz, H., Kebaili-Ghribi, J., Daoud, F., Abdelmalak, N., Ennouri, K., Belguith-Ben Hassan, N., Tounsi, S., Rouis, S., 2015. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against pyralid stored-product pests. Journal of Applied Entomology DOI: 10.1111/jen.12205.

18- Azzouz, H., Daoud, F., Benfarhat-Touzri, D., Tounsi, S., 2014. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* mutants over-producing δ-endotoxins. Journal of Stored Products Research 59, 82-87.

19- Ben Abdallah D, Frikha-Gargouri O, Tounsi S. *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. J Appl Microbiol. 2015 Mar 13. doi: 10.1111/jam.12797.

COLLABORATIONS

Collaborateurs tunisiens : (Nombre total: 10)

- ESAK ElKef : Mr Rhouma Sayari

- CRGC Béja : Mr Houcine Bchini

- INRAT: Mr Mbarek Ben Naceur

- Institut de l'Olivier de Sfax : Mr Mohièddine Kessentini,

- INRAT : Pr A. Hajlaoui

- FSS : Pr H. Mejdoub

- FMS : Pr A. Hammami
- FMM : Pr H. Ben Chaikh

- CTAB : Pr Mohamed Ben Khedr
- ENIS : Pr Khaled Medhioub

Collaborateurs étrangers : (Nombre total: 18)

- Dr. Hervé Sentenac, Supagro Montpellier, France

- Dr. Emmanuel Guiderdoni, CIRAD Montpellier, France

- Pr. Montserrat Pagès, Université de Barcelone, Espagne

- Pr. José Pardo, IRNA Seville, Espagne

- Pr. Roberto Solano, CSIC Madrid Espagne

- Pr. Michael Baum, Integrated Gene Management Program, ICARDA

- Pr. Seo Yong Weon, Crop Molecular Breeding Laboratory, Korea University

- Dr. Jean Philippe Galaud, UPS Toulouse, France

- Pr Samir Jaoua, Université de Doha, Qatar

- Pr Juan Ferré, Université de Valencia, Espagne

- Dr Didier Lereclus, INRA, Versaille, France

- Pr Hedi Hitakura, Japon

- Pr Jean Charles Du Côté, Canada

- Pr Claude Garnier, Montpellier, France

- Pr Khalid Oufdou, Marrakech, Maroc

- Dr Mireille Kallassy, Beyrouth, Liban

- Dr Alain Givaudain, Montpellier, France

- Pr David Pauron, Sophia, France

- Pr. Philippe Jacques, Lille, France

- Dr. François Krier, Lille, France

- Pr. Nelson José de Oliveira Simões, Université des Açores, Portugal

HABILITATION (Nombre total : -)

THESES SOUTENUES (Nombre total : 3)

1- **Siwar Ben Amar :** soutenue le 06-09-2014 à la FSS
2- **Ines ben Fguira :** sera soutenue le 24-12-2014 à la FSS

3- **Jihen Elleuch :** sera soutenue le 24-12-2014 à la FSS

MASTERES SOUTENUS (Nombre total : 9)

1- **Meryem Bradaii :** soutenu le 03 Décembre 2014 à la FSS

2- **Madina Asma Khemakhem :** soutenue le 04 Décembre 2014 à la FSS

3- **Asma Feki :** soutenue le 05-Décembre 2014 à la FSS

4- **Imen Ben Atitatallah :** soutenue le 27-Novembre 2014 à la FSS

5- **Imen Bouchaala :** soutenue le 28- Novembre 2014 à la FSS

6- **Nawal Trabelsi :** soutenue le 09-Décembre 2014 à la FSS

7- **Marwa Bouhlel :** soutenue le 02 Juin 2014 à la FSS

8- **Fatma Boukid :** soutenue le 24 Juillet à l'INAT

9- **Rihab Jbir :** soutenue le 30 décembre 2014à la Faculté des sciences de Sfax

PROJETS DE FIN D'ETUDES DE TECHNICIENS ET D'INGENIEURS

Nom et Prénom		**Titre des projets de fin d'études**
Sana Koubaa	Juin 2014	Etude du système antioxydant chez la plante d'A. thaliana surexprimant la déhydrine du blé dur
Kchaou Hana	Juin 2014	Investigation moléculaire des delta-endotoxines Cry2A de *Bacillus thuringiensis*
Kharrat Kaouthar	Juin 2014	Investigation biochimique des delta-endotoxines Cry2A de Bacillus thuringiensis
Dardouri Seif Eddine	Juin 2014	Expression Hétérologue des facteurs de virulence du nématode Steinernema carpocapsae chez la bactérie *Bacillus thuringiensis*. PFE en Licence Appliquée en Biologie Analytique et expérimentale, Faculté des Sciences de Gafsa.

LISTE DES COMMUNICATIONS OU CONFERENCES INTERNATIONALES

- **Walid Saibi:** Participation at the workshop on NGC (Chromatography Systems) entitled « Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) » 11 December 2014 at the Center of Biotechnology of Sfax, Tunisia.

- **Walid Saibi:** Presentation of conference entitled « Bridging between Hydroxyl distribution in sugar structure and their contributory role in the inhibition of FONGYZYMES: *Stachybotrys microspora* β-glucosidase », 28 April 2014 at Korea University.

- **Slim Tounsi**: Conférence intitulée: "les biopesticides: une recherche fondamentales vers une exploitation industrielle » JIB 2014, Hammamet, Décembre 2014, Tunisie.

- **Souad Rouis,** M. Chakroun, N. abdelmlak and S. Tounsi (2014) Investigation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxicity to *Ephestia kuehniella*. 5th World congress on Biotechnology June 25-27 Valencia, Spain

- **Nouha abdelmlak,** A. Ben Kridis, S. Tounsi and S. Rouis (2014) Screening and isolation of *Bacillus thuringiensis* harboring new cry2 genes toxic against *Ephestia kuehniella*. 5th World congress on Biotechnology June 25-27 Valencia, Spain

- **Raïda Zribi Zghal,** Marwa Kharrat, Jihen Elleuch & Slim Tounsi (2014) Lutte contre les moustiques et les vecteurs de maladies Communication orale présentée dans le 2ème colloque national "Contaminants, Environnement et Santé" dédié à la thématique des pesticides 28 et 29 avril 2014.

MISSIONS EFFECTUEES DANS LE CADRE DE PROJETS DE COLLABORATION

- **Faiçal Brini,** Juin 25-26, 2014: Participation au 2nd International Workshop on Harmonization of GMO Detection and Analysis in the Middle East and North Africa (MENA) Region, Rome-Italy.

- **Moez Hanin,** 15 au 20 avril 2014 : Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, SupAgro Montpellier.

- **Chantal Ebel :** 01 au 15 septembre 2014. CNB Madrid, Espagne.

- **Walid Saibi :** 26/04/2015 au 06/05/2015, University of Korea

- **Inès Yakoubi :** 26/04/2015 au 06/05/2015, University of Korea

- **Slim Tounsi** : du 7 au 12, décembre 2014 : Mission en Allemagne dans le cadre du projet FETRIC.

- **Souad Rouis** : Septembre 2014 Université Saint- Joseph Liban Projet AUF

- **Raida Zribi :** "NGS data analysis workshop" (15-14 Mars 2014) à l'institut Pasteur de Tunis.

- **Raida Zribi:** « High-throughput next generation sequencing applied to infectious diseases » (15 – 25 Septembre 2014) à l'Institut Pasteur de Tunis (Tunis).

- **Wafa Jallouli** : Participation à l'atelier de formation sur la fermentation : de quelques fondamentaux … vers la conduite de culture en bioréacteur ; 02-05 juin 2014 ; Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax.

STAGES EFFECTUES L'ETRANGER (2014)

-**Mouna Ghorbel :** du 22 octobre au 15 décembre 2014. Laboratoire de Recherches en Sciences Végétales (LRSV). Toulouse-France

- **Nibras Belgaroui :** 15 avril-13 juillet 2014. Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, SupAgro Montpellier.

- **Mariem Bradaii :** 30/06/2014 au 01/09/2014. IJPB, INRA-Versaille, France.

- **Asma Feki :** 01/08/2014 au 01/10/2014. CNB, Madrid Espagne.

- **Héla Safi :** 01/092014 au 31/10/2014. Laboratoire de Biotechnologie de Protéines Recombinantes à Visée Santé, Bordeaux- France

- **Dorra Ben Abdallah** : 01-10-2014 au 30-10-2014, Laboratoire Pro BioGem, Université de Lille, France.

- **Wafa Jallouli** : Stage à l'UTC (Université de Technologie de Compiègne) France (Egide): 07-19 décembre 2014.

ETRANGERS EFFECTUANT UN STAGE OU UNE MISSION

- **Hervé sentenac :** Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, INRA-Montpellier, France: 03/09/2015 au 07/09/2015.

- **Anne Aliénor very,** Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, INRA-Montpellier, France: 03/09/2015 au 07/09/2015.

- **Jean Marie Frachisse,** Institut du Végétal, CNRS, Paris-France: 05/09/2015 au 07/05/2015.

- **Nancy Fayad :** étudiante en mastère, Faculté des sciences, université saint Joseph, Liban, 1-9-2014 au 30-09-2014.

- **Mireille Kallassy Aouad :** Faculté des sciences, université saint Joseph, Liban, 29-9-2014 au 03-09-2014.

ORGANISATION DE MANIFESTATIONS

Organisation d'un « Theoretical and practical course » intitulé : "Protein-Protein interaction: Study of Bt toxin-receptor case", du 28 Septembre au 03 Octobre 2014, financé par "International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology".

OBTENTION DE PRIX

-**Prix régional** du concours national d'innovation – PASRI – ANPR – 2014

CONVENTIONS DE COLLABORATION

-Le laboratoire a signé trois conventions de collaboration avec trois entreprises privées :

- HTDS-Tunisie
- SLIMLAB- Tunisie
- Thermo Electron SAS – France.

Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules

(L MB)

مخبرالأحياء الدقيقة والجزيئات الفعالة

Coordinateur : Mr Abdallah Choura

Introduction

Le Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules LMB se compose de 2 équipes LMB 1 et LMB 2 (Pharma) travaillant sur 5 programmes et 9 projets définis comme suit :

LMB 1 : 4 programmes e t 6 projets

Programme		Projets		Responsable
1	Additifs pour alimentation animale	1	Enzymes pour alimentation animale	Hichem Chouayakh
		2	Microorganismes pour alimentation animale (probiotiques)	
2	Enzymes et microorganismes pour applications industrielles	3	Enzymes pour les détergents	Mamdouh Ben Ali
3	Enzymes pour l'agroalimentaire	4	Enzymes pour la panification	Samir Bejar
		5	Enzymes pour la production d'édulcorants	
4	Molécules bioactives bactériennes	6	Purification et caractérisation d'activités antifongiques et antibactériennes utilisables pour la conservation des aliments ou contre des agents pathogènes	Lotfi Mellouli

Liste des membres du laboratoire

Prénom et Nom	Grade	Institution
Samir BEJAR	Professeur	CBS
Ahmed REBAI	Professeur	CBS
Lotfi MELLOULI	Professeur	CBS
Saber MASMOUDI	Professeur	CBS
Mohamed Sami AIFA	Professeur	CBS
Hichem CHOUAYEKH	Professeur	CBS
Mamdouh BEN ALI	Maître de conférences	CBS
Riadh BEN SALAH	Maître de conférences	CBS
Hassen HADJ KACEM	Maître de conférences	CBS
Bassem JAOUADI	Maître de conférences	CBS

Radhouane KAMMOUN	Maître de conférences	ISBS
Mounira Hmani	Maître de conférences	FSS
Aïda HMIDA-SAYARI	Maître assistant	CBS
Najla KHARRAT-BACCOUCHE	Maître assistant	CBS
Imen AYADI	Maître assistant	FSS
Boutheina CHERIF	Maître assistant	ISBS
Noura BOUGACHA	Maître assistant	FSS
Sameh BEN MABROUK	Maître assistant	FS Gafsa
Sonia JEMLI	Maître assistant	FS Gabes
Dorra Ayadi-Zouari	Maître assistant	FS Gafsa
Anis BEN HSOUNA	Maître assistant	FS Gafsa
Slim SMAOUI	Assistant	CBS
Hajer BEN HLIMA	Assistant	FSGafsa
Leila AYADI	Assistant	IPEIS
Salima MAALEJ-BELGHUITH	Assistant	ISBS
Imen BENREBEH	Assistant	
Ines KARRAY-REBAI	Ingénieur en Chef	CBS
Monia Bilbech	Ingénieur Principal	CBS
Monia Mezghani	Technicienne en Chef	CBS

Programme1 ; Projet 1:

Enzymes et bactéries vecteurs d'activités enzymatiques en nutrition/santé animale

Personnel impliqué dans le Projet:

Prof. CHOUAYEKH Hichem (Responsable du Projet)

Dr. BEN SALAH Riadh (Maître de Conférences)

Mme HAMMAMI-BLIBECH Monia (Ingénieur)

Mme FARHAT-KHEMAKHEM Ameny (Postdoc)

Mme BEN FARHAT-GUESMI Mounira (Postdoc)

Doctorantes :

Mme BOUKHRIS Ines

Melle MOUELHI Sana

1. Expression de la phytase de *Bacillus subtilis* US417 chez la plante *Arabidopsis*

Les phytases hydrolysent l'acide phytique (AP) et ses sels (phytates), forme majeure de stockage du phosphore (P) dans les céréales (~60-90%) et qui chélatent des cations bivalents comme le Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+} réduisant leur bio-disponibilité. La faible biodisponibilité du P-phytique chez les animaux monogastriques ne possédant pas d'activité phytase endogène, nécessite la supplémentation de leurs aliments avec du phosphate inorganique (Pi) soluble afin de subvenir aux besoins en P de l'animal. Toutefois, l'ajout de ce Pi ne diminue pas les effets anti-nutritionnels des phytates et augmente la pollution de l'environnement par l'excrétion de fientes très chargées en Pi. L'ajout de phytases exogènes dans les aliments de monogastriques permet d'augmenter leur valeur nutritionnelle en améliorant la biodisponibilité du P-phytique et en diminuant les effets antinutritionnels des phytates et de diminuer (jusqu'à 50%) l'excrétion de Pi dans les fientes contribuant ainsi à la protection de l'environnement.

Dans le cadre de travaux antérieurs réalisés en collaboration avec **la société NUTRISUD/MEDIMIX**, une nouvelle souche bactérienne nommée *Bacillus subtilis* US417 produisant une phytase extracellulaire a été isolée. L'enzyme nommée « PHY US417 » a été purifiée et caractérisée en comparaison avec une phytase commerciale. Ceci a permit de révéler que PHY US417 possède un grand potentiel d'application comme additif en alimentation animale.

En 2014, en collaboration avec le Laboratoire Amélioration et Protection des plantes au CBS et le Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire de Plantes à l' INRA de Montpellier (France), nous avons pu montrer que la surexpression de la phytase bactérienne PHY US417 chez *Arabidopsis* entraine une diminution significative du contenu en AP des graines sans affecter leur potentiel de germination. Il est à noter que cette sur-expression a également induit une remobilisation plus forte du fer libre pendant la germination. En outre, les lignées sur-exprimant PHY US417 montrent une

augmentation du contenu en Pi et sulfate, ainsi qu'une une production de biomasse plus élevée après une carence en phosphate. Enfin, la détection du phosphate a été modifiée à cause des changements dans l'expression des gènes induits par la carence en phosphate ou impliqués dans le transport du phosphate ou du sulfate. Ensemble, nos résultats montrent que la sur-expression de PHY US417 réduit la concentration en AP, et prouvent pour la première fois l'implication de l'AP dans la régulation de l'homéostasie du phosphate et sulfate et de la signalisation (**Belgaroui et al., 2014**).

2. Effets de la supplémentation de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* US573 comme probiotique sur les performances des poulets de chair

Dans un travail antérieur, dans le cadre d'un contrat de recherche collaborative avec **la société ADISSEO FRANCE SAS**, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de la phytase sécrétée par *B. amyloliquefaciens* US573 ainsi que les propriétés probiotiques (résistance aux pH, tolérance aux sels biliaires, absence d'activités enzymatiques néfastes, sensibilité aux antibiotiques, capacité d'adhésion aux entérocytes de poulet...) et les autres activités enzymatiques sécrétées par cette souche bactérienne (activité xylanase et ß-glucanase).

En 2014, en collaboration avec **la société ADISSEO FRANCE SAS** nous avons étudié les effets de la supplémentation de la souche *B. amyloliquefaciens* US573 comme probiotique (à raison de 5 10^8 CFU/kg d'aliment à base de maïs et tourteau de soja sans ajout d'agents coccidiostatiques, d'enzymes hydrolysant les polysaccharides non amylacés et d'antibiotiques promoteurs de croissance) sur les performances des poulets de chair males (Ross PM3). Ainsi deux traitements ont été appliqués (aliment témoin et aliment additionné de la souche US573) avec 12 répétitions de 18 animal/lot sur une période de 35 jours (0-21 jours: phase de démarrage & 22-35 jours: phase de production). Nos résultats montrent que l'ajout de la souche *B. amyloliquefaciens* US573 comme probiotique permet d'améliorer de manière significative le taux de conversion de l'aliment et le gain de poids corporel ainsi que la réduction du taux de mortalité. Un brevet international est en cours de négociation avancée avec **la société ADISSEO FRANCE SAS** avant la publication de ces résultats (article en préparation).

3. Caractérisation et étude de la régulation de l'expression de phytases de *Streptomyces*

Ce sujet est réalisé dans le cadre du projet CMCU n° 11G 0924 (CHOUAYEKH/VIROLLE, 2011-2013).

En 2014, nous nous sommes focalisés sur la continuité d'un travail antérieur concernant la caractérisation de phytase PHY US42 produite par la souche de *Streptomyces* sp. US42. Le gène codant cette activité enzymatique a été clonée pour la première fois à partir d'un actinomycète et séquencé. L'analyse de la séquence du polypeptide codé (PHY US42) a révélé deux et sept résidus différence avec les phytases hypothétiques de *Streptomyces lividans* TK24 et *S. coelicolor* A3 (2), respectivement. PHY US42 a été purifiée et caractérisée. Cette enzyme possède une activité dépendante du calcium (comme les phytases de *Bacillus*), optimale à pH 7 et à 65 °C. PHY US42 est parfaitement stable à des pHs allant de 5 à 10 et sa stabilité thermique est fortement augmentée en présence de calcium. En effet, PHY US42 maintient 80% d'activité après 10 min d'incubation à 75 °C en présence de 5 mM de $CaCl_2$, alors que dans un environnement exempt de calcium, aucune activité n'est détectable après 2 min d'incubation. PHY US42 présente également une grande stabilité après incubation à 37 °C pendant 1 h en présence de bile bovine et de protéases digestives telles que la pepsine, la trypsine et la

chymotrypsine. La modélisation moléculaire de PHY US42 indique qu'elle appartient au groupe des β-propeller phytases qui sont généralement calcium-dépendantes. Compte tenu de ses propriétés biochimiques intéressantes, PHY US42 qui serait principalement active au niveau intestinal, constitue une bonne candidate comme additif dans les aliments destinés aux animaux monogastriques. Ces travaux font l'objet d'un **publication soumise à International Journal of Biological Macromolecules.**

Dans un second volet, nous nous sommes intéressés à la continuité de l'étude de la régulation de l'expression de la phytase de *S. lividans* TK24 chez la souche sauvage de *S. lividans* TK24 ainsi que chez ses deux mutants *ppk* et *phoP*. Pour ce faire, nous avons fusionné les régions promotrices sauvages ou mutées de la phytase avec le gène rapporteur GUS. C'est ainsi que nous avons montré que l'expression de la phytase est induite en condition de limitation en phosphate. L'étude de l'expression du gène phytase dans la construction où nous avons délété les 3 boîtes *pho* en amont de la région -35 a montré une probable régulation positive de l'expression de la phytase par PhoP. L'étude de l'expression du gène phytase avec la construction où les 2 boîtes *pho* en aval du -10 sont délétées nous a permis de démontrer que ce site est le siège d'une régulation négative. Ces travaux font l'objet d'un **publication soumise à Applied Microbiology and Biotechnology.**

4. Criblage et caractérisation de souches de *Bacillus* productrices d'activités β-mannanases

En 2014, nous avons initié un nouveau projet concernant le criblage, la caractérisation et la production de nouvelles β-mannanases bactériennes. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse aléatoire des liaisons β-1,4-mannosidiques dans la chaîne principale des β-1,4-mannanes, glucomannanes et galactomannanes. Elles transforment donc ces polymères en manno-oligosaccharides "MOS" tout en générant une petite quantité de mannose, glucose et galactose. Les MOS font parti des prébiotiques qui pourraient avoir des effets bénéfiques sur la santé animale *via* des modifications de la composition du microbiote intestinal. Dans le secteur de l'alimentation animale, les mannanes sont considérés comme facteurs anti-nutritionnels affectant fortement les performances de production. En effet, ils combinent souvent avec de l'eau, augmentent la viscosité du chyme et bloquent partiellement la surface intestinale, ralentissant ainsi le temps de transit du digesta et réduisant donc le taux de conversion de l'aliment. Pour surmonter ces problèmes, l'enzyme β-mannanase est ajoutée comme additif dans les aliments pour volailles pour digérer les mannanes, améliorer le taux de conversion de l'aliment, les performances de croissance ainsi que la santé animale.

Ainsi dans un premier volet de ce travail, nous nous sommes focalisés sur le criblage de souches bactériennes productrices d'activités mannanases. Ceci a permit de sélectionner 5 souches nommées US134, US150, US176, US180 et US191 produisant une activité manannase en milieux solide et liquide. Ces souches ont été identifiées comme souches de *Bacillus* en se basant sur des méthodes biochimiques et sur un séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S. Les gènes β-mannanase et de l'ARNr 16S de la souche *Bacillus* sp. US191 (produisant l'activité mannanase présentant la meilleure thermoactivité et thermostabilité) ont été par la suite amplifiés par PCR et clonés en vue de leur séquençage. Le potentiel d'application en nutrition/santé animale des β-mannanases susceptibles d'être sélectionnées dans le cadre de cette investigation pourrait être évalué de deux façons. En effet, ces enzymes peuvent être testées soit comme additifs dans les aliments pour volailles, soit utilisées comme biocatalyseurs pour la synthèse de MOS dont l'effet prébiotique sera jugé *in vitro* suite à des tests de stimulation de la croissance de bactéries bénéfiques (lactobacilles) et d'inhibition de la croissance de

bactéries pathogènes (*E. coli*, *Salmonella*...).

Dans un deuxième volet de ce travail, nous avons entamé l'étude des propriétés probiotiques (antagonisme contre les pathogènes, survie dans les conditions du tractus gastrointestinal, profil fermentaire, activités enzymatiques indésirables, sensibilité aux antibiotiques, adhésion aux entérocytes de poulet, digestibilité des céréales...) de la souche *Bacillus subtilis* US417 productrice de phytase ainsi que les souches de *Bacillus* sp. US134, US150, US176, US180 et US191 productrices de β-mannanases. Ceci pourrait nous conduire à la sélection d'une souche pouvant être appliquée comme probiotique vecteur d'activités enzymatiques pour améliorer les performances de production des poulets de chair.

5. Caractérisation des propriétés PGPR de bactéries solubilisant les phosphates inorganiques insolubles

La production d'engrais phosphatés est basée sur le traitement chimique du phosphate brut avec l'acide sulfurique à des températures élevées. Ce processus est à la fois coûteux et nuisible à l'environnement. Donc, le besoin de méthodes alternatives durables et respectueuses de l'environnement s'impose. Les microorganismes ayant la capacité de solubilisation des phosphates inorganiques (SPI) insolubles représentent une alternative.

Dans le cadre d'un travail antérieur réalisé en collaboration avec le **Groupe Chimique Tunisien**, 5 isolats nommés: US540, US537, US549, US557 et US468 ont été sélectionnées pour leur capacité de SPI. La souche US540 identifiée en tant que *Serratia marcescens* et déposée dans la collection Tunisienne de microorganismes avec le nom *Serratia marcescens* CTM 50650 présente la meilleure efficacité de solubilisation suivie par la souche US468 identifiée en tant qu'*Enterobacter* sp. US468.

En 2014, nous avons déterminé chez les souches *S. marcescens* CTM 50650 et *Enterobacter* sp. US468, les caractéristiques PGPR. En effet, CTM 50650 ainsi que US468 sont capables de produire des sidérophores. Pour l'acide indole acétique (IAA), nous avons révélé que *S. marcescens* CTM 50650 produit 134.57 µg IAA/ml. L'activité spécifique de la phosphatase acide et alcaline a été aussi déterminée pour ces deux isolats. En effet elle est égale à 86.86 et 81.24 mU/mg pour CTM 50650 et US468, respectivement. Par la suite, une étude a été réalisée en chambre de croissance, concernant l'évaluation de l'efficacité de CTM 50650 ainsi que US468 dans la promotion de la croissance et le développement de la plante de maïs (en pot) et en combinaison avec un champignon micchorhizien «*Glomus intraradices*». Pour étudier l'effet des acides humiques (AH) sur la croissance des plantes de maïs inoculées par les cellules de CTM 50650 et *Enterobacter* sp. US468 libres ou immobilisées dans des billes d'alginates, nous avons fait une deuxième expérience en chambre de croissance. Ainsi, nous avons pu montrer que ces bactéries stimulent la symbiose mycorhizienne et que la présence des AH dans les cellules immobilisées dans l'alginate stimule d'avantages la SPI ainsi que la croissance des plantes du maïs (**Ben Farhat et al., 2014**).. Ces deux observations sont très significatives et elles auront des applications pratiques très intéressantes.

Publications

Articles publiés:

1. Ben Farhat M., Taktek S., Chouayekh H. (2014) Encapsulation in alginate enhanced the plant growth promoting activities of two phosphate solubilizing bacteria isolated from the phosphate mine of Gafsa. Net Journal of Agricultural Science Vol. 2(4), pp. 131-139, December 2014 ISSN: 2315-9766

2. Belgaroui N., Zaidi I., Farhat A., Chouayekh H., Bouain N., Chay S., Curie C., Mari S., Masmoudi K., Davidian J.C., Berthomieu P., Rouached H., Hanin M. (2014) Overexpression of the bacterial phytase US417 in Arabidopsis reduces the concentration of phytic acid and reveals its involvement in the regulation of sulfate and phosphate homeostasis and signaling. Plant Cell Physiol. 2014 Sep 16. pii: pcu122.

Articles soumis

1. Ines Boukhris, Ameny Farhat-Khemakhem, Marie-Joëlle Virolle & Hichem Chouayekh. Cloning and characterization of the first actinomycete β-propeller phytase from *Streptomyces* sp. US42. Article soumis à International Journal of Biological Macromolecules

2. Ines Boukhris, Thierry Dulermo, Hichem Chouayekh & Marie-JoëlleVirolle. Characterization a strong negative regulatory site in the promoter region of the phytase gene of *S. coelicolor*. Article soumis à Applied Microbiology and Biotechnology

Articles en préparation

Ines Boukhris, Ameny Farhat-Khemakhem, Monia Blibech, Kameleddine Bouchaala, Lamya Rhayat, Estelle Devillard, Marc Maestracci, Marie-Joëlle Virolle & Hichem Chouayekh. Cloning and characterization of the extremely salt-tolerant and highly thermostable phytase produced by the *Bacillus amyloliquefaciens* US573 strain.

Mission

Mission du Prof. Hichem CHOUAYEKH effectuée en France du 20/07/2014 au 07/07/2014 (N°: 043004140032001) au siège de la société ADISSEO France SAS (Antony, région Parisienne).

Participation à des manifestations scientifiques

Participation du Prof. Hichem CHOUAYEKH aux 1ères journées nationales de dynamisation la recherche scientifique (ANPR-PASRI) 15 - 16 Décembre 2014 (Hammamet).

Partie Aida Sayari (Suite Pro1 projet 1)

1.2. Surproduction hétérologue de PHY US 417 dans la levure Pichia pastoris (Intervenants : Aïda Hmida-Sayari, Fatma Elgharbi et Samir Bejar)

Nous avons, par ailleurs, surproduit la phytase PHY US417 chez la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* connue pour sa densité cellulaire très élevée et son excellente capacité de sécrétion. Ainsi, le gène *phy US417* a été cloné dans le vecteur pPICZαB renfermant le peptide signal α de Saccharomyces et transformé dans la souche SMD1168H.

Un clone recombinant a été selectionné, il produit 43 et 227 U/ml de phytase recombinante en erlenmeyer et à l'échelle fermenteur, respectivement, soit environ 300 fois plus que la souche sauvage. Le surnageant de culture a été concentré par diafiltration et ultrafiltration puis l'enzyme recombinante a été purifiée sur colonne d'affinité Ni-NTA. La phytase recombinante purifiée maintient 100% de son activité après 10 min d'incubation à 75 °C et à pH 7.5. L'enzyme exprimée est glycosylée, elle se présente sous différentes tailles allant de 50 à 65 kDa sur gel d'électrophorèse. Elle a une masse de 43 kDa après déglycosylation. Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans Molecular Biotechnologie intitulé « Overexpression and biochemical characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 in *Pichia pastoris*»

Aïda Hmida-Sayari, Fatma Elgharbi, Ameny Farhat, Hatem Rekik, Karine Blondeau and Samir Bejar. Overexpression and biochemical characterization of a thermostable phytase from *Bacillus subtilis* US417 in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology 56 (2014) 839-48.**

1.3. Les glucanases: (Intervenants : Aïda Hmida-Sayari, Fatma Elgharbi et Samir Bejar)

Dans le cadre de la mise en évidence et de la purification de quelques enzymes dégradant les polysaccharides de la paroi cellulaire des végétaux, une souche d'*Aspergillus niger* US368 a été criblée en tant que candidate pour la production de glucanases et xylanases extracellulaires originales. Ces enzymes sont destinées à être incorporées en nutrition animale afin de neutraliser ou de réduire chez l'animal les effets antinutritionnels de certains constituants des céréales, comme le xylane et le β-glucane.

Au cours de ce travail, nous avons purifié l'enzyme β-glucanase de la souche US 368 produite sur milieu à base de farine d'orge et la caractérisation biochimique a révélé des optima de température et de pH respectivement de 60 °C et 5. La taille de l'enzyme purifiée a été estimée à 32 kDa. L'enzyme ne présente pas d'activateur mais par contre son action est inhibée en présence du Cu^{2+}, Fe^{2+} et Mn^{2+} et est légèrement inhibée en présence du Ca^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+} et de Mg^{2+}. Elle est stable pendant une heure à une large gamme de pH allant de 3 à 10. Elle est aussi thermostable à des températures inférieures à 65 °C. L'enzyme n'hydrolyse pas les liaisons β-1,3 (laminarin) et β-1,4 (CM-cellulose) par contre elle hydrolyse le β-glucane et lichenane. L'analyse par CCM, par HPLC et par par spectroscopie de masse des produits d'hydrolyse du β-glucane par cette enzyme montrent que la β-glucanase d'*Aspergillus niger* US 368 est une endo-1,3-1,4-β -glucanase (EC 3.2.1.73). Aussi l'analyse de la configuration du carbone anomérique du glucose (produit final de l'hydrolyse du β-glucane) montre que la β-glucanase

purifiée à partir de la souche *Aspergillus niger* US368 agit par rétention de configuration. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé: « Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lichenase from *Aspergillus niger* US368» accepté dans *Carbohydrate Polymers*.

Fatma Elgharbi, Aïda Hmida-Sayari, Mouna Sahnoun, Radhouane Kammoun, Lobna Jlaeil, Hajer Hassairi, Samir Bejar. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lichenase from *Aspergillus niger* US368. ***Carbohydrate Polymers* 98 (2013) 967– 975.**

D'autre part, nous avons isolé une souche bactérienne productrice d'activité glucanase et qui s'avère intéressante. La caractérisation biochimique préliminaire de la β-glucanase de la souche US570 identifiée en tant que *Bacillus pumillus* US570 a été réalisée avec des extraits bruts non purifiés. L'analyse montre que l'enzyme est active à une large gamme de pH et de température avec une activité maximale à pH 6 et 55 °C. L'enzyme a été purifié et la caractérisation biochimique a révélé des optima de température et de pH respectivement de 55 °C et 6. L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% dans les conditions dénaturantes montre que la glucanase se présente sous forme d'une bande homogène de masse moléculaire apparente d'environ 25 kDa. Cependant, l'analyse sur gel de polyacrylamide 10% dans les conditions natives montre que la glucanase se présente sous forme d'une bande de masse moléculaire d'environ 75 kDa. Ceci suggère que la β-D-glucanase produite par la souche *Bacillus pumillus* US570 est trimérique. A notre connaissance c'est la première fois qu'une glucanase bactérienne soit décrite ayant une structure trimérique.

Par ailleurs, nous avons essayé de cribler le gène codant pour cette glucanase bactérienne. L'amplification par PCR sur l'ADN génomique, en utilisant le couple d'amorce obtenu par alignement de séquence, a généré un fragment de taille de 732 pb. La comparaison de la séquence de ce gène avec la banque de données a montré a montré de fortes homologies avec des gènes de β-1,3 ; 1,4-glucanases du genre *Bacillus* confirmant que ce fragment amplifié correspond au gène de lichenase. La modélisation moléculaire confirme que la β-D-glucanase produite par la souche *Bacillus pumillus* US570 est trimérique.

Ce travail fait l'objet d'un article en cours de rédaction.

1.4. Les xylanases:
(Intervenants : Aïda Hmida-Sayari, Fatma Elgharbi et Samir Bejar)

Outre l'activité glucanase, la souche *Aspergillus niger* US368 produit une xylanase extracellulaire. Dans un travail antérieur, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des conditions de production de la xylanase en milieu liquide. L'activité xylanase maximale obtenue est de 14,5 U/ml après 144 h de culture à 30 °C. L'enzyme a été purifiée et caractérisée, elle présente une bonne stabilité à des pH entre 3 et 9 et à des températures allant jusqu'à 60 °C. La xylanase hydrolyse plus efficacement le xylane birchwood que le xylane beechwood et le xylane oat-spelt. Son mode d'action est de type endo. Le gène qui code pour la xylanase de la souche US368 a été amplifié par PCR, cloné et sa séquence a été déterminée. Ce gène a une taille de 684 pb avec la présence d'un intron de 51 pb. Une étude structurale a été réalisée pour mieux expliquer la stabilité de l'enzyme dans des conditions de pH acide. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé: « Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain» publié dans *Process Biochemistry*.

Aïda Hmida-Sayari, Salma Taktek, Fatma Elgharbi, and Samir Bejar. Biochemical characterization, cloning and molecular modelling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain ***Process Biochemistry* 47 (2012) 1839–1847.**

Par ailleurs, l'unique intron du gène codant cette xylanase, a été délété par PCR. Le cDNA de taille 636 pb a été cloné dans le vecteur PET 28a et le vecteur recombinant a été transformé dans *E. coli* BL21. L'expression de la xylanase dans ce clone est intra cellulaire et atteint jusqu'à 74 U/ml. L'enzyme a été purifiée en deux étapes. La caractérisation biochimique de l'activité xylanase purifiée a révélé des optima de température et de pH respectivement de 50 ° C et 5. Elle est stable dans une large gamme de pH et en présence de certains détergents et des solvants organiques. En présence de 3 mM de Cu^{2+}, l'activité relative de l'His-tagged r-XAn11 a été améliorée de 54%. C'est le premier travail qui rapporte que le cuivre est un puissant activateur de l'activité xylanase. La modélisation moléculaire suggère que la région de contact entre le site catalytique et le peptide His-tag N-terminal pourrait être responsable de la différence de comportement de l'enzyme native et recombinante envers le cuivre. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé: « Expression of *A. niger* US 368 xylanase in *E. coli*: purification, characterization and copper activation » Soumis dans *International Journal of Biological Macromolecules*.

Fatma Elgharbi, Hajer Ben Hlima , Ameny Farhat-Khemakhem 1, Dorra Ayadi Zouari, Samir Bejar and Aïda Hmida-Sayari . Expression of *A. niger* US368 xylanase in E. coli: purification, characterization and copper activation. **International Journal of Biological Macromolecules , Soumis.**

En vue de surproduire cette xylanase, pour tester son efficacité comme additif en alimentation animale et en panification, nous avons cloné l'ADNc du gène de la xylanase XAn11 d'*Aspergillus niger* US368 dans le vecteur d'expression pGAPZα-B et le plasmide recombinant ainsi obtenu a été introduit dans la levure *Pichia pastoris*. Un clone a été choisi pour suivre son cinétique de croissance ainsi que celle de l'activité xylanasique. L'expression de la xylanase dans ce clone atteint jusqu'à 41 U/ml vers le 3ème jour de culture contre 14 U/ml pour la souche sauvage. La purification ainsi que la caractérisation physico-chimique de cette enzyme a montré que la xylanase purifiée a une masse moléculaire d'environ 24 kDa. L'enzyme a été purifiée à partir du surnageant de culture avec un facteur de purification de 1.78 fois, un rendement de 81.4% et une activité spécifique de 910 U mg^{-1}. L'enzyme a une activité optimale à un pH de 4 et 50 ° C et est stable dans une large gamme de pH. Lorsque la xylanase recombinante a été utilisé comme un additif à une très petite quantité dans le pain de blé entier, une diminution remarquable de l'absorption d'eau et une augmentation de l'indice de gonflement de la pâte ont été remarqués. Des améliorations significatives dans le volume et le volume spécifique du pain ont également été enregistrées. La xylanase recombinante a été également utilisé dans la digestion *in vitro* de l'orge et du son de blé conduit à une diminution de la viscosité de l'orge et du son de blé traitée, alors que les sucres réducteurs et sucres totaux ont été augmentés. Ce travail a fait l'objet d'un article intitulé: « Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: application in breadmaking and i*n vitro* digestion» Soumis dans *International Journal of Biological Macromolecules*.

Fatma Elgharbi, Aïda Hmida-Sayari, Youssef Zaafouri, Samir Bejar, Expression of an *A. niger* xylanase in yeast: application in breadmaking and In vitro digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**. Soumis

Programme 1 ; Projet 2 :

Microorganismes pour alimentation animale

Nom du chef du projet : Samir BEJAR (Professeur)

Nom des chercheurs et ingénieurs impliqués :	grade :
Samir BEJAR	Prof
Hichem CHOUAYEKH	Prof
Riadh BEN SALALH	MC
Mamdouh BEN ALI	MC
Wacim BEJAR	Chercheur
Kameleddine BOUCHAALA	Préparateur
Imen TRABELSI	doctorante

2.1 Etude *in vivo* de l'effet d'une souche probiotique *L. plantarum* TN8 sur le traitement de la maladie de colite induite par l'acide sulfonique trinitrobenzène (TNBS)

Dans une étude antérieur, Nous avons passé au crible une centaine de souches de bactéries lactiques, isolées du tractus digestif de poulet ou différents pH (2 à 6) et différentes concentrations en sel biliaire ont été testés (0,3, 1 et 5%). Parmi les souches testées une dizaine, présentant une bonne croissance à pH acide (pH 3) et à forte concentration en sel biliaire (5%), ont été retenues sur les quelles nous avons réalisé l'activité antimicrobienne et la sensibilité aux antibiotiques. Les résultats montrent que parmi les 10 souches sélectionnées, une souche présentant une bonne activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanovii*, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* et sensibles à plusieurs antibiotiques a été retenue. Cette souche, présentant de bonnes propriétés probiotque, a été identifiée par séquençage du gène de l'ARN 16S comme étant *Lactobacillus plantarum* TN8.

Les effets positifs des probiotiques ont été observés dans le traitement de désordres gastrointestinaux comme l'intolérance au lactose, les infections et la prévention de la diarrhée. Ils ont également été testés dans la prévention et le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) telle que la maladie de colite ulcéreuse. Elles se caractérisent

par une inflammation anormale et récurrente du tube digestive, dont les manifestations affectent fortement la qualité de vie des malades (douleurs abdominales, fièvre, malabsorption...). Les traitements existant sont lourds, onéreux et principalement suspensifs. La recherche de nouvelles pistes de prévention ou de thérapie a mis en évidence un intérêt potentiel de souches probiotiques vis-à-vis de ces pathologies digestives : d'une part, parce qu'elles peuvent constituer des vecteurs bactériens pour la libération, dans le tube digestive de protéines d'intérêt santé, d'autre part, parce que certaines souches bactériennes possèdent, par elles-mêmes, des propriétés anti-inflammatoires. Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet d'une nouvelle souche probiotique « *Lactobacillus plantarum* TN8 » dans le traitement de la maladie de colite induite par l'acide sulfonique 2-4-6-trinitrobenzène (TNBS) chez les rats.. Les résultats trouvés ont montré que le traitement avec *L. plantarum* TN8 a réduit la perte de poids, diarrhée, l'inflammation de la muqueuse du côlon. En outre, les rats traités par *L. plantarum* TN8 ont montré une diminution significative du cholestérol total de 1,86 (pour les rats témoins) à 1,3 mmol/l et des triglycérides (TG) de 2,09 (pour les groupe des rats contrôle) à 1,23 mmol / l pour les rats traités avec *L. plantarum* TN8. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) - cholestérol montre une augmentation de 0,95 et 1,02 mmol / l respectivement dans le groupe a reçu le TNBS et les rats traités avec la souche TN8. Des études histologiques de tissus du foie et des reins ont montré que les rats traités avec TN8 présentent une architecture normale par rapport à ceux du groupe témoin. De ce fait, nos résultats suggèrent que *L. plantarum* TN8 pourrait être utilisée pour prévenir ou réduire la sévérité de certaines pathologies intestinales.

2.2 Effet de l'addition dans la formulation de la souche probiotique *Lactobacillus plantarum* TN8 immobilisé, sur les performances zootechniques des poulets de chair.

L'industrialisation de l'élevage des animaux et l'amélioration de l'efficacité nutritionnelle d'un aliment oblige à avoir recours à l'emploi d'additifs alimentaires dont l'utilisation s'est généralisée en alimentation animale depuis de nombreuses décennies : ceci pour augmenter la production tout en maintenant un bon état général de santé de ces animaux. Aussi l'amélioration de la production est devenue d'une grande importance économique et a fait l'objet de nombreuses recherches. Les antibiotiques ont aussi été administrés, à faible dose, dés 1946 dans l'alimentation des animaux en tant que promoteur de croissance. L'apparition puis l'augmentation de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques à partir de 1960 et la mise en place, en 1970, d'une réglementation européenne concernant l'usage des additifs en alimentation animale ont conduit une réduction progressive des molécules antibiotiques utilisables en tant qu'additifs en alimentation animale. Les antibiotiques sont progressivement remplacés par des produits possédant une image « naturelle » telle que les probiotiques, qui suscitent becoup d'intérêt. Dans ce contexte, nous avons étudié l'efficacité nutritionnelle chez le poulet de chaîr d'un probiotique immobilisé ainsi que son impact sur quelques paramètres sanguins. Les résultats trouvés montrent que les poulets expérimentaux (dont l'alimentation est additionnée avec *L. plantarum* TN8 immobilisé) présentent une croissance plus élevée que celle du lot témoins. Les poids moyens à la fin de l'expérimentation c'est-à-dire 35 jours sont respectivement de 1880 g chez les poulets du lot expérimental, tandis qu'ils sont de 1800 g

chez ceux du lot témoin. L'évolution de la consommation d'aliment par semaine montre que l'incorporation de *L.plantarum* TN8 dans l'aliment de poulet de chair a une influénce positive sur leur appétibilité. De même, La supplémentation de la ration alimentaire des poussins avec *L.plantarum* TN8 immobilisé réduit significativement le taux du cholestérol (HDL et LDL) ainsi que la teneurs de triglycerides durant toutes les phases d'élevage. A travers de notre étude, il ressort que l'utilisation du probiotique (*L.plantarum* TN8 immobilisé) dans les régimes alimentaires des poussins a montré que les effets les plus probants se font sur les performances zootechniques, mais également sur les résultats biochimiques obtenus, entraînant une incidence économique et sanitaire favorable non négligeable.

PUBLICATIONS

-Imen TRABELSI, Dorra AYADI, Wacim BEJAR, Samir BEJAR, Hichem CHOUAYEKH et **Riadh BEN SALAH. (2014)** Effects of probiotic immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity**. International Journal of Biological Macromolecules**.**64:** 84-89.

ENCADREMENT

Projet de fin d'étude de technicien supérieur (ISBS)

- **Titre du sujet :** Etude des propriétés microbiologiques et texturales de la saucisse fraiche « Merguez » formulée avec la souche *Lactobacillus plantarum* TN8.

Programme 2 ; Projet 3 :

Enzymes pour les détergents, pour le textile et pour le traitement des cuirs

- **Chef du projet** : Prof. Mamdouh BEN ALI

- **Equipe de recherche** :

Prof. Mamdouh BEN ALI, Dr. Bassem JAOUADI, Prof. Samir BEJAR, Mme Monia MEZGHANI-ABID, Mr. Kameleddine BOUCHAALA ; Mme Nadia ZARAI JAOUADI et Mlle Lobna DAOUD.

3.1 Introduction

Afin de mettre à la disposition pour le secteur économique des enzymes protéolytiques et amylolytiques potentiellement utilisables en détergence, en tannerie et textile et de promouvoir l'innovation dans ses secteurs, nous avons développé des études de criblage, de caractérisation, d'amélioration et de production de ces enzymes.

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des hydrolases qui catalysent les réactions de coupure des liaisons peptidiques. Ce sont les plus dominantes dans le marché de ventes d'enzymes industrielles et représentent environ 65% du marché mondial. Toutefois, cette part d'enzymes commercialisées est dominée par les protéases alcalines utilisées notamment dans la détergence. Ces enzymes actives et stables dans les conditions de pH extrêmes occupent approximativement 40% du marché mondial..

Afin de mettre à disposition pour le secteur économique des enzymes protéolytiques potentiellement utilisables en tannerie et en détergence, nous avons développe des études de criblage, d'études d'améliorations et de production de ces enzymes protéolytiques. Au cours de l'année 2014, le travail a été focalisé essentiellement sur les protéases à activité kératinolytique pour les opérations de rivière (confitage et épilage-pelanage enzymatique) dans le traitement du cuir ainsi que d'autres activités protéases en tant que bio additive pour la formulation des détergents de lavage liquides et solides. Au cours de 2014, les travaux ont concerné essentiellement les protéases pour les détergence et la tannerie.

3.2. Enzymes protéolytiques pour la détergence et le traitement du cuir

3.2.1. Etude des relations structures-fonctions de la SAPB et génération des mutants SAPBs plus performants

Nous avons déjà étudié une protéase très adaptée pour la détergence dite SAPB à partir de la souche *B. pumulis* CBS (Jaouadi et al., 2008, 2009) et nous avons également construits des mutants plus performants (Jaouadi et al., 2010, 2011). Lors de ce projet et afin de surproduire la SAPB et ces mutants dérivés, les gènes *sapB* ont été clonés, surexprimés et purifiés dans la souche *B. subtilis* DB430 déficiente en protéases (Zaraî Jaouadi et al., 2012). La SAPB-L31I/T33S/N99Y montre une excellente activité, stabilité et compatibilité avec les

détergents de lavage. Par ailleurs et en collaboration avec la Sté KLIN PRODUCTIONS (Z.I. Jebeniana, Sfax), nous avons fourni de grande quantité l'enzyme triple mutante pour la formulation dans les produits de détergents solides et liquides (Dipex et Ecovax) de cette société.

D'autre part, dans le cadre d'un projet PNRI-Enzymes 2012-2015 en collaboration avec le Centre National de Cuir et de la Chaussure (CNCC) à Mégrine (Ben-Arous) et la Sté de tannerie/mégisserie SO. SA. CUIR (M'Saken, Sousse), nous avons également montré que les enzymes SAPBs sont adéquates pour les opérations de rivière (épilage-pelanage et confitage enzymatique). En effet, L'enzyme SAPB-N99Y a été trouvée d'avoir la meilleure activité kératinolytique, et le meilleur degré d'hydrolyse. La spécificité vis-à-vis des substrats et la cinétique enzymatique utilisant des peptides synthétiques, a révélé une forte préférence pour l'acide aminé aliphatique (valine) en position P1 dans le cas de kératinases et l'acide aminé aromatique (phénylalanine) en position P1/P4 pour les subtilisines. La modélisation moléculaire suggère que le résidu Leu31 est impliqué dans un réseau d'interactions hydrophobes qui pourraient effectuer le contact de l'enzyme avec le site de liaison du substrat S4. Ce contact est allongé par la mutation L31I facilitant ainsi la pénétration d'un résidu phénylalanine en position P4. Le modèle SAPB-T33S a montré que la mutation T33S pourrait conduire à élargir le sous-site S2 suggérant ainsi son importance dans la spécificité via-à-vis du substrat. Cette étude est la première à démontrer les activités kératinolytique et d'épilage enzymatique prometteuses de la SAPB et surtout la transformation d'une subtilisine en une kératinase et *vice-versa*.. Par ailleurs, la rSAPB produite par *B.* subtilis DB430/pNZ1 a été utilisée par nos partenaires (le CNCC et la société SO.SA.CUIR) pour développer, un processus d'épilation enzymatique respectueux de l'environnement. Les croûtes teintées produites par épilation enzymatique montrent de meilleures propriétés physico-chimiques lors de la comparaison avec le procédé chimique conventionnel. En outre, le processus enzymatique abouti à une réduction significative des paramètres de pollution. Cette étude nous a permis également de conclure que l'épilage-pelanage et le confitage enzymatique moyennant respectivement les protéases rSAPB et SAPB-L31I/T33S/N99Y remplace avec succès l'épilage-pelanage et le confitage chimique conventionnel qui utilisent des produits polluants comme l'hydroxyde de calcium et le sulfure de sodium ainsi que les solvants organiques et les tensioactifs synthétiques. Nous avons également optimisé les conditions de production des protéases SAPB sauvage et mutante à l'échelle fermenteur, en collaboration avec l'Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR) au CBS, utilisant des sous produits de thon comme milieu de production vue sa grande richesse en sources protéiques (46%). Le procédé est essentiellement basé sur la fermentation suivie des procédés de séparation membranaire.

3.2.2. Criblage et étude de nouvelles protéases : cas de SAPRH, KERUS, AMPP et STAP

Au cours d'un travail antérieur réalisé au laboratoire LBM-CBS sur l'isolement et le criblage de nouvelles souches productrices de protéases agissant dans des conditions extrêmes, une souche bactérienne, isolée d'un sédiment de gisement pétrolier frais issu du champ gazier et pétrolier off shore « Hasdrubal » (figure 4). La souche a été identifiée en étant que *Bacillus*

safensis RH12. .). L'enzyme purifiée présente une masse moléculaire apparente de 28 kDa et une activité spécifique, mesurée sur la caséine de 37000 U/mg à pH 9 et à 60°C. Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine du fait qu'elle est inhibée essentiellement par la PMSF et le DFP. Sa thermoactivité et sa thermostabilité sont considérablement améliorées par le calcium à 2 mM. L'efficacité catalytique, sur caséine, de la SAPRH est de 2,34 fois par rapport à l'enzyme de Novozymes A/S nommée Alcalase 2,5 L, type DX. Par ailleurs, la protéase SAPRH présente également une stabilité remarquable, par rapport à l'Alcalase 2,5 L, type DX, en présence de surfactant des tensioactifs, des agents de blanchiments. La protéase SAPRH est complètement stable et compatible, par rapport à l'enzyme commerciale, avec les détergents liquides et solides (Ecovax, Dipex et Dixan) contre 75, 90 et 95% pour l'enzyme commerciale Alcalase 2,5 L, type DX.

Le gène, nommé *sapRH* (1,2 kb), codant pour la SAPRH a été cloné, séquencé et surexprimé chez *E.* coli BL21(DE3)pLysS. L'analyse de la séquence nucléotidique montre une phase de lecture ouverte (ORF) de 1149 pb (383 aa) qui code pour un peptide signal de 87 pb (29 aa), un pro-peptide de 237 pb (79 aa) et la protéase mature de 825 pb (275 aa), biologiquement actif. La protéine recombinante (rSAPRH) s'exprimant chez *E. coli* dans l'espace extracellulaire, possède des caractéristiques identiques à celles trouvées pour la protéine native

Lors de ce projet, nous avons isolé également et caractérisé les extraits enzymatiques de plusieurs nouvelles souches bactériennes à partir de différents biotopes de la Tunisie productrices de kératinases. Ceci a permis de sélectionner une nouvelle kératinase alcaline à sérine (nommée KERUS) qui à été purifié et caractérisée à partir de la souche de *Brevibacillus brevis* US575 nouvellement isolée à partir du sol contaminé de la tannerie/mégisserie SO. SA. CUIR. L'activité optimale de la KERUS (7500 U/ml) a été obtenue à pH 8 et 40 ° C sur kératine azure. Par ailleurs, les paramètres cinétiques, le potentiel kératinolytique ainsi que le clonage et la manipulation génétique du gène *kerUS* codant cette kératrinase ont été déterminés pour une éventuelle application dans des procédés industriels surtout de tannerie. L'analyse de la séquence nucléotidique ainsi obtenue nous a permis d'identifier une phase de lecture ouverte de 1149 pb qui code pour une pré-pro-kératinase, correspondante à 383 aa, organisée en trois régions : un peptide signal de 29 aa (87 pb), un pro-peptide de 79 aa (237 pb) et la protéase mature active de 275 aa (825 pb). La comparaison de cette séquence protéique de la KERUS montre des identités significatives de 98% avec les autres protéases décrites auparavant. La kératinase KERUS se distingue par une large spécificité vis-à-vis des substrats, un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique meilleure que les enzymes commerciales actuellement utilisées dans les opérations de rivière en tannerie (NUE 12 MG et KOROPON® MK EG). Ainsi, la KERUS pourrait avoir une éventuelle utilisation dans le traitement du cuir surtout lors de l'étape d'épilage enzymatique car elle montre un niveau d'épilage très remarquable sur des peaux brutes de lapin, de chèvre, de vache et de mouton.

Nous avons également isolé de nouvelles souches protéolytiques dont notamment la souche *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 produisant une quantité importante de protéase extracellulaire (9000 U/ml) qui a été purifiée puis caractérisée. L'enzyme purifiée est nommée

AMPP. Il s'agit d'une métalloprotéase monomérique ayant une masse moléculaire de 33015,18 Da. Sa séquence NH_2-terminale montre une forte homologie avec les élastases de *Pseudomonas*. Cette enzyme montre une activité optimale en présence de 5 mM Co^{2+} à pH 12 et 80 °C. L'AMPP se distingue par une meilleure efficacité catalytique, tolérance aux solvants organiques et un degré d'hydrolyse élevé par rapport aux élastases commerciales. Le gène *lasB* (n° d'accès JX970630) codant l'AMPP a été cloné, séquencé et exprimé dans l'espace extracellulaire chez *E. coli* HB101. La protéine recombinante (rAMPP) purifiée possède les caractéristiques physico-chimiques et cinétiques identiques à celles trouvées pour la protéine native. Cette métalloenzyme demeure active et stable en présence de solvants organiques et pourrait être ainsi considérée comme une candidate potentielle pour une éventuelle application en tant que biocatalyseur dans la synthèse peptidique et bioadditif biologique dans la formulation des détergents de lavage liquides et solides.

Par ailleurs, une souche d'Actinomycète protéolytique, nouvellement isolée à partir d'un effluent pétrolier de la compagnie British Gas à Mahres (Sfax, Tunisie), a été identifiée en tant que *Streptomyces koyangensis* TN650 moyennant les techniques de taxonomie classique et moléculaire. Par la suite, une protéase (nommée STAP) produite par cette souche été purifiée et caractérisée. Les techniques de purification utilisées dans ce travail, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène ayant une masse moléculaire 45125,17. Sa pureté a été également vérifiée par le séquençage de son extrémité NH_2-terminale (27 aa), qui montre une forte homologie avec les protéases à sérine de *Streptomyces*. L'optimum de l'activité kératinase est obtenu à pH 10 et à 70 °C sur caséine. Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des protéases à sérine thiol-dépendante du fait qu'elle est inhibée essentiellement par la PMSF et le DFP, d'une part, et le DTNB, NEM, iodoacétamide, DTT et 2-ME, d'autre part. Sa thermoactivité et sa thermostabilité sont considérablement améliorées par le calcium à 3 mM. Cependant, le cadmium, le nickel et le mercure inhibent totalement cette activité enzymatique. Le gène *stap* de taille 1,9 kb (n° d'accès KR677133) codant la STAP a été cloné, séquencé et exprimé dans l'espace extracellulaire chez *E. coli* HB101. Nous avons montré également que la STAP se distingue par une large spécificité vis-à-vis des substrats, un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique meilleure en comparant avec les protéases SG-XIV et KERAB. La protéase STAP, montre une bonne activité, stabilité et tolérance en présence de divers solvants organiques à 50% (v/v) en particulier en présence d'isopropanol, de DMF, de chloroforme et du *n*-heptane. Enfin, la protéase STAP présente aussi une stabilité remarquable en présence de sel (1,5 M NaCl), des surfactants (SDS, LAS), des tensioactifs (Tween 20 et 80 et Triton X-100), des agents de blanchiments (perborate de sodium, H_2O_2) et certains détergents commerciaux liquides et solides (Tide, Nadif et OMO). Ainsi, la nouvelle enzyme STAP de la souche d'Actinomycète *Streptomyces koyangensis* TN650 semble être intéressante et pourrait être utilisée dans des applications biotechnologiques comme additif biologique dans les détergents liquides et solides, puisqu'elle a un pH optimum d'activité alcalin.

<u>En 2014</u>, ce travail a donné lieu à :

<u>1- Deux publications parues dans des revues scientifiques indexées (à facteur d'impact):</u>

1. Nadia Zaraî Jaouadi, Bassem Jaouadi, Hajer Ben Hlima, Hatem Rekik, Mouna Belhoul, Maher Hmidi, Houda Slimene Ben Aicha, Chiraz Gorgi Hila, Abdessatar Toumi, Nushin Aghajari & Samir Bejar. Probing the crucial role of Leu31 and Thr33 of the *Bacillus pumilus* CBS alkaline protease in substrate recognition and enzymatic depilation of animal hide. ***PLoS One***, 9(9) (2014), e108367.
2. Bassem Jaouadi, Abdelmalek Badis Hatem Rekik, Nadia Zaraî Jaouadi, Mouna Belhoul, Maher Hmidi, Sidali Kourdali, Djamila Fodil, & Samir Bejar. Production, purification, and characterization of a highly thermostable and humic acid biodegrading peroxidase from a decolorizing *Streptomyces albidoflavus* strain TN644 isolated from a Tunisian off-shore oil field. ***International Biodeterioration and Biodegradation*** 90 (2014) 36-44.

<u>2. Trois brevets d'invention auprès de l'Institut National de la Normalisation et de la Propriétés Industrielle (INNORPI):</u>

1. <u>Nadia Zaraî Jaouadi</u>, Bassem Jaouadi, Hatem Rekik, Hajer Ben Hlima, Maher Hmidi, Ilem Hassairi, Houda Slimene Ben Aicha, Chiraz Gorgi Hila, Samir Bejar & Abdessatar Toumi. Applications des protéases rSAPB et SAPB-L31I/T33S/N99Y produites par les souches de *Bacillus subtilis* DB430 hébergeant les plasmides pNZ1 et pNZ2 pour respectivement les opérations d'épilage-pelanage enzymatique et de confitage lors de traitement du cuir. ***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE N° de dépôt TN2014/0065*** du 14 Février **2014**.
2. <u>Nadia Zaraî Jaouadi</u>, Bassem Jaouadi, Hajer Ben Hlima, Hatem Rekik, Mouna Blehoul, Maher Hmidi & Samir Bejar. Un mutant dérivé de la protéase alcaline du *Bacillus pumilus* CBS (nommée SAPB-N99Y) doué d'une activité kératinase très importante et rôle crucial des résidus de Leu31, de Thr33 et d'Asn99 dans la reconnaissance du substrat et dans la dégradation des plumes de volailles. ***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE N° de dépôt TN2014/0055*** du 07 Février **2014**.
3. Mouna Belhoul, **<u>Nadia Zaraî Jaouadi</u>**, Hatem Rekik, Maher Hmidi, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. Etude d'une nouvelle sérine thiol-dépendante protéase alcaline thermoactive et thermostable produite par la souche de *Streptomyces koyangensis* TN650 ayant un intérêt industriel dans la synthèse peptidique et dans la formulation des détergents de lavage. ***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé*** le 30 Juillet **2014**.

<u>3- Une habilitation universitaire en génie biologique soutenue:</u>

- Bassem JAOAUDI : Sujet «*Protéases et peroxydases bactériennes d'intérêts biotechnologiques*». **Diplôme d'Habilitation Universitaire en Génie Biologique de l'Ecole Nationale d'ingénieurs de Sfax (Université de Sfax - TUNISIE).** Soutenance : 14 Mai 2014 à l'ENIS.

4- Une thèse de doctorat en sciences biologiques soutenues:

- **Nadia ZARAI JAOUADI** : Sujet «*Etude des propriétés biochimiques, moléculaires et structurales de protéases microbiennes d'intérêts industriels*». **Diplôme de thèse de doctorat en Sciences Biologique Diplôme d'Habilitation Universitaire en Sciences Biologiques de la Faculté des Sciences de Sfax (Université de Sfax - TUNISIE)**. Soutenance : 29 Novembre **2014** à la FSS. Encadreurs : Prof. Samir BEJAR et Dr. Bassem JAOUADI.

5- Un mastère professionnel soutenu:

- MASTÈRE DE professionnel (Régime LMD) : Diplôme de mastère en Agro-Alimentaires et Alimentation : Contrôle qualité et Sécurité)/Etablissement : Faculté des Sciences de Sfax (FSS)/Candidate : Mouna BELHOUL/Date de soutenance : Le 02 Juin **2014** à la FSS/Encadreur : Dr. Bassem JAOUADI/ Titre : «Production, purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle protéase de *Bacillus safensis* RH12 d'intérêt biotechnologique».

Programme 3 ; Projet 4 :

Enzymes pour la panification

Nom du chef du projet : Prof. Samir BEJAR

Nom des chercheurs, ingénieurs et étudiants impliqués :

Prof Samir BEJAR, Dr. Radhouane KAMMOUN, Dr.Mamdouh BEN ALI, Dr.Sonia JEMLI, Dr. Sameh Ben Mabrouk Dr. Dorra AYADI, Mme Mouna SAHNOUN, Mlle Mouna KRIAA

4.1 Introduction

Afin d'améliorer la qualité du pain l'ajout d'enzymes en tant qu'additifs en panification devient de plus en plus une pratique très courante. Parmi les enzymes les plus utilisées, l'amylase améliorant de panification, l'amylase anti-rassissante et la glucose oxydase. L'alpha amylase «améliorant de panification », est actuellement totalement importée en Tunisie ; elle permet de standardiser les farines et palier aux déficiences d'amylases endogènes. Les amylases ajoutées en tant qu'agent anti-rassissant préviennent la rétrogradation de l'amidon et préserve la fraîcheur du pain lors du stockage. Par ailleurs, la glucose oxydase (GOD) pourrait remplacer les additifs à action oxydante tels que l'acide ascorbique ou le bromate de potassium. Les études réalisées en 2014 concernent essentiellement l'amylase fongique de panification et la glucose oxydase.

2. Amylase fongique de panification

Dans le cadre de ce projet, nous avons isolé une souche productrice d'α-amylase identifiée comme *Aspergillus oryzae* S2 non productrice d'aflatoxine. Cette souche produit deux isoformes nommées AmyA et AmyB en culture liquide et un troisième AmyC en en milieu solide (SSF : Solide State Fermentation) ayant des propriétés identiques à celles déjà utilisées en panification notamment pour le produit d'hydrolyse de l'amidon. Sur le plan moléculaire, nous avons réussit l'amplification et le clonage d'un fragment de 2 kb, du gène codant pour l'α-amylase d'*Aspergillus oryzae* S2. La détermination de la séquence du fragment en entier, montre qu'il renferme 8 exons et 8 introns. Ces exons coderaient pour une phase de lecture ouverte (ORF) de 1500 pb codant une protéine de 500 aa ayant une identité de 99% avec des amylases d'*Aspergillus oryzae* et d'*Aspergillus niger*. Au cours de 2014, nous avons synthétise un fragment d'ADN (équivalent au cDNA) qui englobe toutes les exons codant pour l'alpha amylase. Après clonage du fragment et vérification de sa séquence, ce fragment a été cloné sous le contrôle du promoteur αOX1 dans le vecteur navette *E.coli/ Pichia pastoris* pPICZ α. La transformation de cette construction dans *Pichia pastoris* est en cours. Ceci permettra une bonne expression/production et d'entamer une étude des relations structure-fonction de cette enzyme.

Ce travail a généré en 2014 un article publié :

- Sahnoun M, Kriaa M, Elgharbi F, Ayadi DZ, Bejar S, Kammoun R. Aspergillus oryzae S2 alpha-amylase production under Solid State Fermentation: Optimization of culture conditions. ***Int J Biol Macromol.*** S0141-8130(15) **(2014)** 00037-9.

3. Glucose oxydase de panification

Les glucose oxydases (GOD) catalyse l'oxydation par l'oxygène du α-D-glucose en D-gluconolactone avec formation de peroxyde d'hydrogène. Lors de ce projet une souche dite k38 productrice de GOD a été isolée et identifiée comme étant *Aspergillus tubingensis*. Nous avons montré que cette enzyme possède une température optimale de 30 ° C et un pH optimum de 5,5. Elle présente aussi une grande stabilité sur une large plage de température et de pH (3-10) et conserve 100 % de son activité à pH acide et neutre et plus de 80 % de son activité à pH alcalin. Nos études ont montré aussi que la meilleure production est obtenue après 32 h de culture, avec du saccharose comme source de carbone et de corn steep liqueur et de nitrate de sodium comme source d'azote et 3 % de $CaCO_3$. En plus, l'application de la méthodologie expérimentale a conduit à une production de la glucose oxydase de 81,48 U/ml soit 2,6 fois plus élevée que dans un milieu non optimisée (31,25 U/ml). L'optimisation de la production à l'état solide a conduit à une activité de glucose-oxydase (170,59 U/ml) supérieure que dans une culture submergée (81,48 U/ml).

Ce travail a généré en 2014 un article publié :

Mouna Kriaa, Ayadi-Zouari D., Sahnoun M., Jemli S., Bejar s. and Kammoun R. Improved stability and reusability of cotton-immobilized recombinant *Escherichia coli* producing US132 Cyclodextrine Glunanotransferase. ***Ann.Microbiol.*** Accepted May **2014**.

Partie Radhouane Kammoun(Suite Programme 3 ; Projet 4: Enzymes pour la panification)

Personnel impliqué dans le Projet:

Dr. KAMMOUN Radhouan, Maître de Conférences (Responsable du Projet)

Pr. CHOUAYEKH Hichem

Mr. BOUCHAALA Kameleddine (Préparateur)

Doctorantes:

Melle KRIAA Mouna
Melle BAYAR Nadia
Melle BEN RHOUMA Marwa
Melle MASMOUDI Rahma

Mastères:
Melle SOUISSI Imen
Melle CHARFI Mouna

1. Amylase fongique de panification

Les travaux antérieurs ont permis d'isoler une souche fongique (*Aspergillus oryzae* S2) ayant une bonne activité amylase. (Sahnoun et al., 2012). Nous avons optimisé les conditions de production de l'amylase de d'*A. oryzae* S2 aussi bien en culture liquide qu'en culture en Semi solide (SSF) et ce dans le but d'une éventuelle application à l'échelle industrielle (Sahnoun et al., 2015).

Au cours de l'année 2014, nous nous sommes intéressés à étudier les propriétés physico chimiques, rhéologiques et nutritionnelles de l'amidon hydrolysé par l'alpha-amylase d'*Aspergillus oryzae* S2 et acétylé et son effet sur la qualité du cake. Ce projet de recherche est réalisé en collaboration avec la société **LE BON GOUT**. L'amidon de maïs a été acétyle avec de l'acétate de vinyle, hydrolysé enzymatiquement par l'alpha amylase d'*Aspergillus oryzae* S2 et doublement modifié. Les résultats ont montré que l'amidon acétylé hydrolysé a un pourcentage plus élevé de groupes acétyle, et un degré de substitution plus élevé que l'amidon acétylé et la plus faible teneur en sucres réducteurs que l'amidon hydrolysé. La viscosité de refroidissement, et la teneur en amylose des amidons modifiés ont été observés à diminuer ($P < 0,05$), tandis que l'humidité, l'eau et la capacité d'absorption d'huile ont été notées à augmenter pour le produit hydrolysé, suivie par acétylé et plus prononcée avec le produit doublent modifié. Ce dernier a permis une augmentation de la résistance à la digestibilité en fonction de la durée de l'étape préliminaire d'hydrolyse par l'enzyme pour atteindre un niveau de 67% après 1 h d'hydrolyse. Cette résistance est plus marquée si la durée des étapes préliminaires de modification a été prolongée. Les amidons modifiés ont été ajoutés à la formulation du cake à des niveaux de 5 et 10% basés sur l'addition de farine de blé par rapport à l'amidon natif. On montre qu'à une concentration de

5%, on assiste à une réduction de la dureté, la cohésion, l'adhésion et la masticabilité en plus de l'amélioration de l'élasticité, le volume, la hauteur, la couleur de la croûte, et l'aspect du cake cuit obtenu avec les amidons modifiés. Ces effets ont été plus prononcés pour le cake incorporant les amidons doublement modifiés (acétylés et hydrolysés). Cependant, l'utilisation d'amidons modifiés à 10% de la concentration n'a pas d'effet positif sur les propriétés étudiées du cake (Sahnoun et al., article soumis).

2. Glucose oxydase fongique de panification

Les travaux antérieurs ont permis d'isoler une souche fongique (*d'Aspergillus tubingensis* CTM 507 est KM594388) ayant une bonne activité glucose oxydase (GOD). Nous avons optimisé les conditions de production de la GOD d'*A. tubingensis* CTM 507, moyennant la méthodologie de la recherche expérimentale, aussi bien en culture liquide qu'en culture en Semi solide (FSS) et ce dans le but d'une éventuelle application à l'échelle industrielle (deux articles en révision : Soumis pour publication : un article à Comptes rendus Biologies CRBIOLOGIES-D-15-00013 et article à J Chem Technol Biotechnol JCTB-15-0259). Ainsi, la FSS a conduit à un accroissement des activités du GOD (170,59 U / ml contre 43,73 U / ml par FMS).

Au cours de l'année 2014 et dans un autre volet de ce travail, la glucose oxydase (GOD) produite par le champignon *Aspergillus tubingensis* a été évaluée dans un ensemble de tests toxicologiques pour documenter sa sécurité d'utilisation en collaboration avec Pr. Abdelfatteh EL FEKI du Laboratoire d'Ecophysiologie Animale à la Faculté des Sciences de Sfax. L'administration par voie orale de la préparation GOD à des rats à un niveau de 0,4 mg / kg de poids de corps de dose / jour n'a provoquée aucun effet toxique manifeste sur la survie, le gain de poids et la consommation de la nourriture pendant toute la période de traitement de 4 semaines. Les changements statistiquement significatifs dans les indices biochimiques du sérum dans les groupes traités comme l'augmentation dans les niveaux de glucose dans le sang et les activités enzymatiques de l'alpha amylase, de l'aspartate aminotransférase et de la phosphatase alcaline étaient pas concomitante avec des changements histopathologiques pertinentes sur le plan toxicologique et sont donc sans conséquence. Pas de lésions microscopiques attribuables au traitement se sont manifestées dans les groupes expérimentaux. Le niveau de dose testée n'a pas d'effet nocif de toxicité observé pour le développement chez les rats. La GOD peut être considérée comme un candidat pour une application future, en particulier dans l'industrie alimentaire (Kriaa et al., 2014)

Par ailleurs, l'impact de la glucose oxydase (GOD) de l'*Aspergillus tubingensis* CTM 507 partiellement purifiée utilisée, en collaboration avec la **société TRANSFORMATION DES PATES ALIMENTAIRES (STPA**), en combinaison avec α-amylase et de l'acide ascorbique sur les propriétés de la pâte, les qualités et la durée de conservation du pain a été étudiée en utilisant le plan d'expérimentale simplex barycentrique. Des modèles de régression de paramètres de l'alvéographe et de texture de pâte et du pain ont été ajustés. En effet, le mélange de glucose oxydase (44%; 9.4.10-4g / kg de farine), l'acide ascorbique (56%; 0,73 g / kg de farine) et de l'amylase α- (0%; 4.10-3g / kg de farine) sur la farine contenant un améliorant de base a montré son potentiel afin d'obtenir de meilleures propriétés fonctionnelles et rhéologiques de la pâte et d'améliorer sa texture. Ce système peut être utilisé comme une action corrective pour réduire les problèmes de pâte causés par l'utilisation excessive de l'alpha amylase et donc d'améliorer les conditions de fabrication et les paramètres technologiques de panification. De plus, la farine de blé contenant des additifs basales et enrichi en GOD (63,8%; 1.14.10-

3g / kg de farine), l'acide ascorbique (32%; 0,59 g / kg de farine) et de l'amylase α- (4,2%; 4.13.10-3 g / kg de farine) a conduit à des paramètres technologiques de panification élevés, à diminuer la fermeté de la mie et la masticabilité et améliorer l'élasticité, l'adhérence, la cohésion et le volume spécifique du pain. En plus de cela, l'addition de la formulation optimisée réduit de manière significative l'activité de l'eau et réduit, par conséquent, la susceptibilité du pain à la contamination microbienne. Ces résultats ont démontré que GOD pourrait remplacer en partie non seulement l'acide ascorbique mais aussi α-amylase. Les modèles générés ont permis de prédire le comportement de la farine de blé contenant des additifs dans la plage de valeurs testées et pour définir la formule des additifs qui conduit à des qualités rhéologiques désirées et de cuisson de pâte. Ce fait offre de nouvelles perspectives pour compenser les carences de la qualité de la farine au moment de la sélection des matières premières et des paramètres technologiques réduisant les coûts de production et en facilitant le développement de produits sans gluten.

Publications

Article Publié

Kriaa M., Mnafgui K., Belhadj S., El Feki A. & Kammoun R. (2015) The developmental evaluation of Aspergillus tubingensis CTM 507glucose oxydase toxicity in wistar rats Journal of Food Safety ISSN 1745-4565

Articles Soumis

1. Kriaa M., Hammami I., Sahnoun M., Cheffi Azeboub M., Ali Triki M. and **Kammoun R.** Biological control of tomato plant diseases caused by Fusarium solani using a new isolated Aspergillus tubingensis CTM 507 Glucose oxidase Soumis pour publication à Comptes rendus Biologies CRBIOLOGIES-D-15-00013

2. Kriaa M.,and **Kammoun R**. Producing Aspergillus tubingensis k38 Glucose oxidase by SSF versus SmF: process optimization and enzyme stability by an intermediary metabolite in relation with diauxic growth. Soumis pour publication à J Chem Technol Biotechnol JCTB-15-0259

3. Kriaa M., Grabab H., Ouhibib R., Besbesb S., Jardak M. and **Kammoun R**. Synergistic effect of Aspergillus tubingensis CTM 507 glucose oxidase in presence of ascorbic acid and alpha amylase on dough properties, baking quality and shelf life of bread Soumis pour publication à journal of food science and technology. Manuscript number: JFST-D-14-01677

Organisation d'un Workshop

Dr. Radhouane KAMMOUN a fait partie du comité d'organisation d'un workshop : Atelier de Formation sur la Fermentation. De quelques fondamentaux….. vers la conduite de cultures en Bioréacteur. ISBS-Sfax-Tunisie. Du 02 au 05 Juin 2014**.**

Programme 3 ; Projet 5 :

Enzymes pour la production d'édulcorants

Nom du chef du projet: Prof Samir BEJAR

Nom des chercheurs et ingénieurs impliqués :

Prof. Samir BEJAR, Dr. Hichem CHOUYAKEH, Dr. Mamdouh BEN ALI, Dr. Hajer BEN HALIMA, Mme. Monia MEZGAHNI-ABID,

5.1 Introduction et rappels des résultats antérieurs

Ce projet concerne le criblage, l'amélioration, la production et la mise en œuvre d'enzymes (isomérases) pour la production d'édulcorants ayant un pouvoir sucrant élevé et une faible valeur calorique. Dans le cadre de ce projet, nous avons continué essentiellement les études structure-fonctions du glucose isomerase de *Streptomuces* sp. SK (GISK), généré des mutants plus performants et avancé dans la mise au point d'un procédé de production d'un sirop riche en D-Fructose et D-tagatose à partir du lactosérum en mettant en œuvre la GISK et L-arabinose Isomérase de *Bacillus stearothermophilus* US100 (LAIUS100).

5.2. Etude des relations structure-fonction de la GISK

Les études moléculaires ont révélé une boucle du coté NH_2-terminale qui pourrait avoir un rôle dans les propriétés biochimique de la GISK. Chez les GIs de classe II comme la GI du genre *Thermotoga* cette boucle contient deux acides aminés de plus que chez les GIs de classe I tel que la GISK. Ainsi nous avons inséré une Histidine en position 17 et une Phénylalanine en position 19 pour obtenir la séquence HTFV au lieu de TV. L'étude de l'effet de cette insertion sur les propriétés physicochimiques de la GISK a révélé que cette insertion entraine une légère baisse de la thermostabilité par rapport à l'enzyme sauvage. Cette étude à révélée aussi que cette insertion entraine le décalage du pH optimum de l'enzyme de 6,5 à un palier de maximum d'activité de pH 7 à pH 8. Ce résultat est très intéressant vu que les GIs du genre *Thermotoga* sont caractérisé par leur pH neutre donc la présence d'une boucle courte pourrait jouer un rôle primordial dans le pH optimum acide de la GISK.

5.3. Mise au point d'un procédé de fabrication de sirop de fructose et de D-tagatose.

La conception d'un procédé pour la production d'un sirop contenant du D-tagatose et du D-fructose à partir du lactosérum a été décrite antérieurement. Ce procédé comporte une étape d'hydrolyse du lactose en D-glucose et D-galactose suivie d'étapes d'ultrafiltration et de déminéralisation. Toutes ces étapes ont été optimisées lors de ce projet. En effet, le lactosérum subit une étape de microfiltration suivie d'une ultrafiltration afin d'éliminer au maximum la fraction protéique. La fraction riche en lactose ainsi obtenue est alors sujette à une étape de déminéralisation. Au fait nous avons démontré que cette étape est un peu limitant puisqu'il est obligatoire pousser cette déminéralisation afin d'éliminer toute trace de Ca^{2+}, très inhibiteur de

la réaction de bioconversion du glucose en fructose par la Glucose Isomérase. Afin de surmonter ce problème, nous avons construit une souche portant la GISK double mutant F53L/G219D (non inhibé par les ions Ca^{2+}) co-exprimé avec la L-AI US100 dans une même souche recombinante (Figure 1) afin de l'utiliser à la place de la souche HB101/pHB4

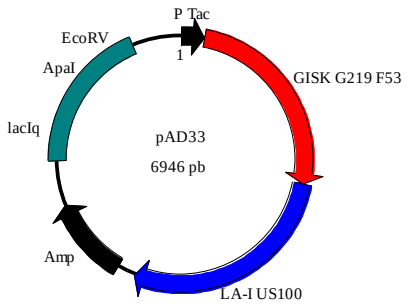


Figure 1: Carte de restriction du plasmide pAD33.

Par ailleurs, nous étions confrontés lors de la mise au point de ce procédé à un autre facteur limitant qui est la production de quantités importantes de cellules recombinantes exprimant les deux activités d'une façon économique. Ainsi, nous avons focalisé notre étude sur l'augmentation du rendement en biomasse de la souche recombinante. Nous avons ainsi testé plusieurs sources de carbone (glycérol, fructose, mannose, galactose et glucose). Des résultats préliminaires montrent que l'utilisation de glucose à raison de 2 g/l augmente l'activité GI et L-AI de 20 et de 15%, respectivement. En plus, l'addition de 2 g/l de galactose augmente l'activité GI de 35% et l'activité L-AI de 18%. Ces résultats encourageants vont être peaufinés et utilisés pour la production en batch alimenté pour la production de quantités importantes des cellules exprimant les deux activités ; ce qui va nous permettre de produire des quantités importantes de sirop afin de le tester avec des industriels.

Ce travail a généré un article publié en **2014** :

- Ben Hlima H. Zouari Ayadi D., Mezghani M., Bejar S., Nushin A. Probing the role of helix <alpha>1 in the acid-tolerance and thermal stability of the *Streptomyces* sp. SK Glucose Isomerase by Sit

Partie Riadh Ben Salah (Suite Programme 3 ; Projet 5: Production et Formulation de biofilms bactériens en agroalimentaire)

Personnel impliqué dans le Projet:

Dr. BEN SALAH Riadh, Maître de Conférences, (Responsable du Projet)

Prof. CHOUAYEKH Hichem

Dr. KAMMOUN Radhouane (Maître de Conférences)

Mme KARRAY-CHOUAYEKH Sondès (Maître Assistante)

Mr. BOUCHAALA Kameleddine (Préparateur)

Doctorants :

Mme TRABELSI Imen

Melle BEN SLIMA Sirine

Mr. BOUHELI Mohamed

1. Etude *in vivo* de l'effet d'une souche probiotique *L. plantarum* TN8 sur le traitement de la maladie de colite induite par l'acide sulfonique trinitrobenzène (TNBS) et amélioration de certains paramètres biochimiques

Les effets positifs de probiotiques ont été observés dans le traitement de désordres gastrointestinaux comme l'intolérance au lactose, les infections et la prévention de la diarrhée. Ils ont également été testés dans la prévention et le traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) telle que la maladie de colite ulcéreuse. Elles se caractérisent par une inflammation anormale et récurrente du tube digestif, dont les manifestations affectent fortement la qualité de vie des malades (douleurs abdominales, fièvre, malabsorption...). Les traitements existants sont lourds, onéreux et principalement suspensifs. La recherche de nouvelles pistes de prévention ou de thérapie a mis en évidence un intérêt potentiel de souches probiotiques vis-à-vis de ces pathologies digestives : d'une part, parce qu'elles peuvent constituer des vecteurs bactériens pour la libération, dans le tube digestif des protéines d'intérêt médical, d'autre part, parce que certaines souches bactériennes possèdent, par elles-mêmes, des propriétés anti-inflammatoires. Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet d'une nouvelle souche probiotique « *Lactobacillus plantarum* TN8 » dans le traitement de la maladie de colite induite par l'acide sulfonique 2-4-6-trinitrobenzène (TNBS) chez les rats.. Les résultats trouvés ont montré que le traitement avec *L. plantarum* TN8 a réduit la perte de poids, diarrhée, l'inflammation de la muqueuse du côlon. En outre, les rats traités par *L. plantarum* TN8 ont montré une diminution significative du cholestérol total de 1,86 (pour les rats témoins) à 1,3 mmol/l et des triglycérides (TG) de 2,09 (pour les groupe des rats contrôle) à 1,23 mmol / l pour les rats traités avec *L. plantarum* TN8. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) -cholestérol montre une augmentation de 0,95 et 1,02 mmol / l respectivement dans le groupe a reçu le TNBS et les rats traités avec la souche TN8. Des études histologiques de tissus du foie et des reins ont montré que les rats traités avec TN8 présentent une architecture normale par

rapport à ceux du groupe témoin. De ce fait, nos résultats suggèrent que *L. plantarum TN8* pourrait être utilisée pour prévenir ou réduire la sévérité de certaines pathologies intestinales.

2. Effet de l'addition dans la formulation de la souche probiotique *Lactobacillus plantarum* TN8 immobilisée, sur les performances zootechniques des poulets de chair

L'industrialisation de l'élevage des animaux et l'amélioration de l'efficacité nutritionnelle d'un aliment oblige à avoir recours à l'emploi d'additifs alimentaires dont l'utilisation s'est généralisée en alimentation animale depuis de nombreuses décennies : ceci pour augmenter la production tout en maintenant un bon état général de santé de ces animaux. Aussi l'amélioration de la production est devenue d'une grande importance économique et a fait l'objet de nombreuses recherches. Les antibiotiques ont aussi été administrés, à faible dose, dés 1946 dans l'alimentation des animaux en tant que promoteurs de croissance. L'apparition puis l'augmentation de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques à partir de 1960 et la mise en place, en 1970, d'une réglementation Européenne concernant l'usage des additifs en alimentation animale ont conduit une réduction progressive des molécules antibiotiques utilisables en tant qu'additifs en alimentation animale. Les antibiotiques sont progressivement remplacés par des produits possédant une image « naturelle » telle que les probiotiques, qui suscitent beaucoup d'intérêt. Dans ce contexte, nous avons étudié l'efficacité nutritionnelle chez le poulet de chair d'un probiotique immobilisé ainsi que son impact sur quelques paramètres sanguins. Les résultats trouvés montrent que les poulets expérimentaux (dont l'alimentation est additionnée avec *L. plantarum* TN8 immobilisée) présentent une croissance plus élevée que celle du lot témoin. Les poids moyens à la fin de l'expérimentation c'est-à-dire 35 jours sont respectivement de 1880 g chez les poulets du lot expérimental, tandis qu'ils sont de 1800 g chez ceux du lot témoin. L'évolution de la consommation d'aliment par semaine montre que l'incorporation de *L.plantarum* TN8 dans l'aliment de poulet de chair a une influence positive sur leur appétibilité. De même, la supplémentation de la ration alimentaire des poussins avec *L.plantarum* TN8 immobilisé réduit significativement le taux du cholestérol (HDL et LDL) ainsi que la teneurs de triglycerides durant toutes les phases d'élevage. A travers notre étude, il ressort que l'utilisation du probiotique (*L.plantarum* TN8 immobilisée) dans les régimes alimentaires des poussins a montré que les effets les plus probants se font sur les performances zootechniques, mais également sur les résultats biochimiques obtenus, entraînant une incidence économique et sanitaire favorable non négligeable.

Publications

Imen TRABELSI, Dorra AYADI, Wacim BEJAR, Samir BEJAR, Hichem CHOUAYEKH et **Riadh BEN SALAH. (2014)** Effects of probiotic immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity**.** International Journal of Biological Macromolecules.**64:** 84-89.

Encadrement

Projet de fin d'étude de technicien supérieur (ISBS).

Titre du sujet : Etude des propriétés microbiologiques et texturales de la saucisse fraiche « Merguez » formulée avec la souche *Lactobacillus plantarum* TN8.

Programme 4 ; Projet 6:

Biomolécules pour des applications industrielles et agricoles

Personnel impliqué dans le Projet:

Prof. MELLOULI Lotfi (Responsable du Projet)

Dr. SMAOUI Slim (Assistant au LMB depuis Octobre 2013)

Mme KARRAY-REBAI Ines (Ingénieur en Chef)

Mr. HMIDI Maher (Technicien Principal)

Etudiantes :

Mme CHAKCHOUK-MTIBAA Ahlem (Doctorante)

Mme NAJAH-BEN YOUSSEF Soumaya (Doctorante)

Melle SELLEM Imen (Doctorante)

Melle KAANICHE Fatma (Doctorante)

Melle LAHMAR Aida (Master)

Situation du Programme de Recherche

Actuellement on assiste à un problème très épineux qui est la résistance de certains microorganismes (bactéries et champignons) aux molécules antibactériennes et antifongiques communément utilisées. De plus, l'utilisation de fongicides chimiques dans le domaine agricole pour lutter contre les phytopathogènes, engendre des conséquences très néfastes sur l'écologie (nappes phréatiques, sols et air), la faune, la flore et l'être humain. Les fongicides naturels, synthétisés biologiquement sont de plus en plus recherchés puisqu'ils agissent sur les phytopathogènes à faibles doses et sont biodégradables. Dans le domaine agro-alimentaire, les aliments que nous consommons sont en grande majorité d'origine biologique (végétale ou animale) et les modifications microbiologiques (par le développement de microorganismes altérants et pathogènes) qu'ils subissent, les rendent très vite inconsommables et voir impropres à la consommation. Pour combattre ces microorganismes pathogènes, plusieurs travaux de recherche sont actuellement orientés vers la découverte de nouvelles molécules bioactives pour des applications industrielles et agro-alimentaires.

L'objectif global du thème de recherche molécules bioactives est de contribuer à la découverte de nouvelles biomolécules pour des applications industrielles, agricoles et agro-alimentaires. Ces biomolécules sont recherchées à partir de microorganismes notamment les bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* (qui sont à l'origine de 70% des antibiotiques produits naturellement à l'échelle industrielle), de bactéries lactiques (qui sont très utilisées dans l'industrie agro-alimentaire vu leurs caractères GRAS) et à partir de quelques plantes locales et même endémiques. Par ailleurs, il est à noter

que, outre la recherche de nouvelles biomolécules naturelles à partir de microorganismes et de plantes, la tendance actuelle est également orientée vers la construction de nouvelles biomolécules hybrides *via* les techniques de génie génétique. Pour cette réalisation il faut d'une part passer par une étape de construction d'une banque de gènes de plusieurs voies de biosynthèse de métabolites secondaires biologiquement actifs et d'autre part, analyser et révéler les fonctions de ces gènes ainsi que les mécanismes de régulation de leur expression. Dans ce cadre, parmi nos objectifs, la construction d'une banque de gènes de deux voies de biosynthèse de biomolécules de la famille des rhamnopyranosides jamais étudiées et ayant des activités anticancéreuses. Cette réalisation permettra à moyen terme la construction de nouvelles biomolécules hybrides.

1. Rappel des résultats antérieurs

1.1. Sur les plans microbiologiques et physico-chimiques

Bactéries Actinomycètes : Les molécules bioactives de neuf souches de *Streptomyces* nouvellement isolées (US24, TN58, US80, TN97, TN17, TN256, TN262, TN272 et TN258) ont été extraites, purifiées et caractérisées par les moyens spectroscopiques. Environ quatre vingt molécules ayant des activités antibactériennes et /ou antifongiques et/ou antitumorales ont été identifiées. Ces molécules appartiennent à différentes classes à savoir : macrolides, dérivés de dikétopipérazines, rhamnopyranosides, coumarins, indol-éthanol, dérivés de tyramines, dérivés de brevinamide, peptides cycliques, dérivés d'esters, glycopeptides cycliques, etc. Des essais en pots de quelques unes de ces biomolécules contre des phytopathogènes à savoir le *Fusarium oxysporum* responsable de la pourriture racinaire et du flétrissement de la tomate, et le *Pythium ultimum* responsable de la pourriture aqueuse de la pomme de terre ont été réalisés et les résultats obtenus sont encourageants. Des essais d'induction des voies de biosynthèses cryptiques de métabolites secondaires ont été réalisés. Dans un cas nous avons pu augmenter la production des mêmes biomolécules et dans un autre cas nous avons réussi l'obtention d'une nouvelle biomolécule (par comparaison avec les souches non induites).

Bactéries Lactiques : Plusieurs souches ont été isolées à partir de différentes origines et puis testées pour leur capacité de produire des « bactériocines » par le biais de tests microbiologiques et biochimiques. Cette étude nous a permis de sélectionner quelques isolats dont TN635, FL31 et J1 identifiées respectivement comme étant *Lactobacillus plantarum* sp. TN635, *Enterococcus faecium* sp. FL31 et *Weissella paramesenteroides* J1.

- La bactériocine « BacTN635 » de la souche TN635 a été purifiée *via* quatre étapes de purifications successives. L'activité spécifique de BacTN635 purifiée est de l'ordre de 197368 UA/mg de protéines. La masse exacte déterminée par spectroscopie de masse est de 3847 Da. Les études de mode d'action de BacTN635, ont montré que BacTN635 a un effet bactéricide contre *Listeria ivanovii* et fongistatique contre *Candida tropicalis*. Des essais d'applications de BacTN635 semi-purifiée dans la conservation de la viande hachée du bœuf, de l'escalope de poulet et du salami de dinde lors du stockage à 4°C ont montré que cette bactériocine permet d'une part, de prolonger la durée de conservation et d'autre part, d'améliorer de façon très nette les qualités microbiologiques, organoleptiques, sensorielles et texturales de ces dérivés de viande.

- BacFL31 présente une activité dans une large gamme de pH comprise entre 2 et 9 avec un optimum entre 5 et 7 et elle est insensible à un traitement thermique de 100°C pendant 90 min. BacFL31

a été purifiée à homogénéité en adoptant quatre étapes de purification et présente une masse moléculaire de l'ordre de 3,5 kDa.

- BacJ1 présente une activité dans une large gamme de pH comprise entre 2 et 10 avec un optimum entre 4 et 7 et elle est thermorésistante. BacJ1 a été purifiée à homogénéité en adoptant trois étapes de purification et sa masse moléculaire exacte est de 1881.036 Da

1.2. Sur le plan moléculaire

Pour les deux souches : US24 (qui produit trois biomolécules dont le dérivé de DKP Cyclo « L-Phe, L-Pro ») et TN58 (qui produit cinq molécules bioactives dont deux de la famille des rhamnopyranosides), nous avons optimisé les conditions de leur conjugaison intérgénérique *E. coli*/*Streptomyces via* un plasmide intégratif. Les sites d'attachements *attB* correspondants ont été détectés, clonés, séquencés et analysés.

* Souche US24 : Par des techniques de disruption de gènes, la voie de biosynthèse du dérivé de DKP de la souche US24 a été détectée. Une banque cosmidique a été construite et analysée. Deux fragments d'ADN de taille 1,9 kb et 3 kb ont été séquencés. Les analyses des séquences correspondantes révèlent la présence de divers domaines (Adénylation « **A** », condensation « **C** », Thiolation « **T** ») de voies NRPS. Ceci suggère que la voie de biosynthèse du DKP de la souche US24 est du type NRPS, différente de celle décrite chez *S. noursei*.

* Dans des travaux antérieurs, nous avons identifié et caractérisé une région d'environ 9kb qui contient 10 gènes dont 4 seraient impliqués dans la biosynthèse du rhamnose. Ce sucre constitue une partie intégrale de la structure de molécules de la famille des acyl α-L-rhamnopyranosides. Nous avons construit une souche mutante de *Streptomyces sp*. TN58 déletée dans le gène qui code une cétoreductase susceptible d'être impliqué dans la biosynthèse du rhamnose et montré que cette souche mutée ne produit plus les deux molécules de rhamnopyranosides. En dehors des quatre gènes impliqués dans la biosynthèse du rhamnose, les autres gènes présents dans cette région, entre autre un gène qui code une glycosyltransférase, ne semblent pas êtres impliqués dans la biosynthèse des rhamnopyranosides. Ceci est inhabituel car chez les *Streptomyces* les gènes de biosynthèse d'un métabolite secondaire donné sont en général groupés en cluster !

2. Travaux réalisés durant l'année 2014

Il est à noter que nous avons poursuivie, durant l'année (2014), le programme d'isolement et de criblage de nouvelles bactéries actinomycètes et lactiques. Certaines souches ont été sélectionnées pour des études approfondies.

2.1. Bactéries Actinomycètes

2.1.1. *Etudes microbiologiques, biochimiques et tests in vivo*

Durant l'année 2014, les travaux de recherche se rapportant aux bactéries actinomycètes, ont été focalisés sur la souche TN258 qui a été sélectionnée *in vitro* pour ses activités inhibitrices contre plusieurs phytopathogènes (bactéries et champignons) et par conséquent elle pourrait avoir un potentiel d'application dans le domaine de l'agriculture biologique. Des tests *in vivo*, en collaboration avec

l'Institut de l'Olivier de Sfax, de l'extrait bioactif de la souche TN258 ont été réalisés contre les phytopathogènes : la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* et les deux champignons *Pythium ultimum* et *Verticillium dahalea* tout en utilisant comme plantes modèles la tomate, la pomme de terre et l'olivier. Les résultats préliminaires obtenus sont très intéressants et à titre d'exemple, **la Figure 1**, représente l'effet de l'extrait bioactif de la culture de la souche TN258 sur la croissance des hyphes du phytopathogène *Pythium ultimum*

Fig. 1. The inhibition effect of TN258 active supernatant on the growth of *P. ultimum* hyphae (magnification, 100X). **(A)** control (100 □l sterilized water), **(B)** Hyphae treated with 100 □l of active supernatant at 50 mgml^{-1}.

2.1.2. *Etudes moléculaires*

Comme nous l'avons signalé dans la partie travaux antérieurs, les gènes de biosynthèse des deux molécules rhamnopyranosides de la souche TN58 semblent êtres éparpillés sur le chromosome et non pas sous forme de cluster. Cette situation très originale nous a obligé de séquencer la totalité du génome de la souche TN58 pour chercher tous les gènes impliqués dans la ou les voies de biosynthèse de ces deux biomolécules. Pour ce faire, nous avons préparé 3 banques mate-pair avec une sélection de taille 3-5 kb, 5-7 kb et 7-10 kb. Les profils obtenus sont très satisfaisants surtout pour les deux banques mate-pair 3-5 et 5-7 Kb. **La figure 2** présente le profil de la banque mate-pair 5-7 Kb.

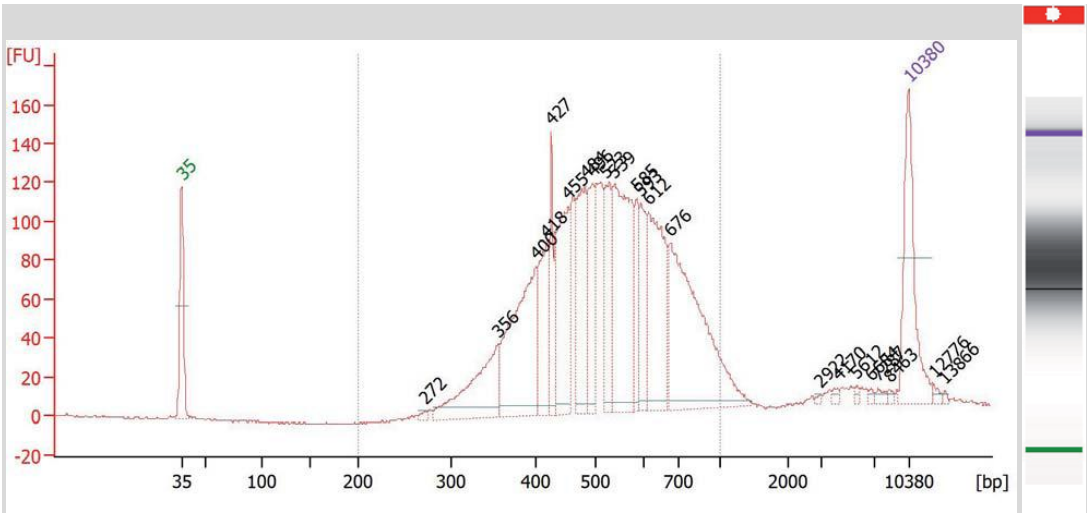


Figure 2. Banque mate pair 5-7 Kb

Après des analyses des différentes banques préparées, nous avons décidé d'utiliser la répartition suivante : 2/3 banque TN58 paired ends "classique" ; 1/6 banque TN58 mate-pair 3-5 kb et 1/6 banque TN58 mate-pair 5-7 kb. Un séquençage du génome a été réalisé par haut débit et l'assemblage des séquences a été réalisé grâce à ABySS Assembler : Assembly By Short Sequences, ce qui a permis d'obtenir 97 contigs. Il s'agit de séquences continues, résultant de l'assemblage de courtes séquences chevauchantes provenant de lectures initiales. La taille du génome de la souche TN58 est de 8 Mb.

2.2. Bactéries lactiques

Durant l'année 2014, notre intérêt a été porté vers les deux bactériocines BacFL31 et BacJ1.

- BacFL31 : La séquence NH_2 terminale de cette bactériocine nous a permis d'identifier vingt-trois résidus qui sont : **GLEESXGHXGQXGPXGPXGAXGP** (X c'est un hydroxyproline), 7 Gly, 1 Leu, 2 Glu, 1 S, 1 His, 1 Gln, 3 Pro, 1 Ala, et 6 hydroxyprolines (Hyp). Il est à noter que la séquence en acides aminés de la bactériocine BacFL31 est originale. En effet, c'est la première fois qu'une bactériocine soit décrite avec des résidus d'hydroxyprolines. L'addition de BacFL31 à 400 AU/g, a un effet très bénéfique sur l'amélioration de la qualité microbiologique de l'escalope de dinde hachée crue durant le stockage à 4°C. En effet, par comparaison avec l'échantillon contrôle (non additionné avec BacFL31), nous avons constaté d'une part une diminution très remarquable de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), de la flore psychrophile et des *Enterobacteriaceae* et d'autre part, une inhibition totale de la croissance des bactéries pathogènes *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* et une inhibition partielle du pathogène *Staphylococcus aureus*. De plus, BacFL31 agit très positivement sur les caractéristiques physico-chimiques (sr-TBA, pH, MetMb et couleur) durant le stockage à 4°C de l'escalope de dinde hachée crue. En effet, BacFL31 fait retarder de manière significative le développement du rancissement oxydatif, elle assure une stabilité du pH durant le stockage, elle fait chuter le taux de la metmyoglobine (MetMb) et elle permet de garder la couleur vive de la viande.

- BacJ1 : La détermination de la séquence NH_2 terminale de BacJ1 purifiée a permis l'identification de dix résidus : **GPAGPFGKLY** (3 Gly, 2Pro, 1 Ala, 1Phe, 1Lys, 1 leu et 1 Tyr). En comparant cette séquence avec les autres séquences de bactériocines, il n'existe aucune homologie de séquence totale avec les bactériocines trouvées dans les bases de données BACTIBASE. Ceci prouve que BacJ1 est une nouvelle bactériocine. BacJ1 possède un effet bactéricide contre le pathogène *Salmonella typhimurium* et son application à l'état semi-purifiée à une concentration de 400 UA/g est une méthode très efficace pour prévenir et éliminer la contamination par le pathogène *S. typhimurium* dans l'escalope de dinde crue lors du stockage à 4°C.

2.3. Biomolécules à partir de plantes

Nous avons initié depuis l'année 2011 des recherches sur les molécules bioactives et les huiles essentielles à partir de plantes locales. Le but général de cette étude est la recherche, à partir d'extraits et d'huiles essentielles de plantes des activités biologiques à savoir : antimicrobiennes, antioxydantes et anticholinestérases. Jusqu'à maintenant cinq plantes ont été étudiées et pour chaque plantes, les études ont porté sur les trois parties: la tige, les feuilles et les fruits. Les résultats sont résumés comme suit :

- L'huile essentielle d'une plante a été analysée par GC/MS et analysée pour ses activités antimicrobiennes et antioxydantes. Nous avons également montré que la combinaison de cette huile avec la bactériocine BacTN635 améliore nettement la durée de conservation et les qualités microbiologiques, physicochimiques, texturales et sensorielles des viandes hachées du bœuf durant le stockage à 4°C et ce en comparaison avec les résultats obtenus en utilisant uniquement BacTN635.

- Les activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticholinestérases des extraits bioactifs obtenus par des extractions avec plusieurs solvants organiques des trois parties (tige, feuilles et fruits) de quatre plantes ont été déterminés et analysées. Il est à noter que parmi ces extraits, et d'après les études préliminaires, un extrait présente une activité anticholinestérase intéressante.

Perspectives

- Poursuivre le programme d'isolement et de sélection de microorganismes producteurs de biomolécules.
- Poursuivre le programme d'analyse des extraits et d'huiles essentielles de nouvelles plantes
- La confirmation des résultats obtenus *in vivo* des extraits bioactifs de quelques souches d'actinomycètes ayant des activités antagonistes contre les phytopathogènes comme *Fusarium oxysporum, Pythium ultimum* et *Verticillium dahlae* à grande échelle : sous serres et extrapolation en champs. Ces études seront réalisées en collaboration avec l'institut de l'olivier de Sfax et des Centres Techniques.
- Des essais des bactériocines caractérisées dans le domaine de conservation des produits agro-alimentaires à grande échelle. Une telle réalisation nécessite l'implication d'industriels et de centres techniques.
- Approfondir les études sur les extraits de plantes sélectionnés d'après les études préliminaires

- Après le séquençage de tout le génome de la souche TN58, l'objectif est de détecter et caractériser tous les gènes impliqués dans les voies de biosynthèses des deux molécules anticancéreuses de la famille des rhamnopyranosides secrétées par cette souche.

Publications

1. S. Smaoui, L. Elleuch, R. Ben Salah, S. Najah, A. Chakchouk-Mtibaa, I. Sellem, S. Besbes and **L. Mellouli***. Efficient role of BacTN635 on the safety properties, sensory attributes, and texture profile of raw minced meat beef and chicken breast**. (2014)**. *Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **31** (2) : 218–225
2. A. Chakchouk-Mtibaa, L. Elleuch, S. Smaoui, S. Najah, I. Sellem, S. Abdelkafi, **L. Mellouli***. An antilisterial bacteriocin BacFL31 produced by *Enterococcus faecium* FL31 with a novel structure containing hydroxyproline residues. **(2014)**. *Anaerobe*, **27**, 1-6
3. A. Chakchouk-Mtibaa, L. Elleuch, S. Smaoui, S. Najah, I. Sellem, H. Mejdoub, S. Abdelkafi, **L. Mellouli***. Characterization of the bacteriocin BacJ1 and its effectiveness for the inactivation of *Salmonella typhimurium* during turkey escalope storage. (2014). *Food Chemistry*, **152** : 566–572

Projet de Coopération

Projet CMCU (Mellouli/Pernodet), code 12G-0819- 2012-2014: Détection, analyse et ingénierie des voies de biosynthèse de molécules bioactives de la famille des rhamnopyranosides à partir de souches de *Streptomyces.*

Mission

Prof. MELLOULI Lotfi : Mission de 10 jours (du 16 / 06 / 2014 au 25 / 06 / 2014) au Laboratoire de Microbiologie Moléculaire des Actinomycètes. Orsay, Paris Sud – France dans le cadre du projet CMCU (MELLOULI / PERNODET) code 12G0819.

Stage d'étudiant

NAJAH Soumaya : Etudiante en thèse. Stage de 03 mois du 01 / 09 / 2014 au 30 / 11 / 2014 au Laboratoire de Microbiologie Moléculaire des Actinomycètes. Orsay, Paris Sud – France dans le cadre du projet CMCU (MELLOULI / PERNODET) code 12G0819

Mastère

LAHMAR Aida. Mastère de Recherche en « Biologie et ecophysiologie des organismes végétaux » de Mademoiselle : intitulé : *Valorisation de l'huile essentielle d'une plante aromatique Tunisienne Mentha piperita: étude de son potentiel conservateur en combinaison avec la bactériocine BacTN635 sur la viande hachée du bœuf*. (Soutenu le 26/11/2014).

Programme 5 ; projets 7-8-9

Liste des membres de l'équipe LMB PHARMA (Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire) :

Nom et prénom	**Grade /Qualité**
Ahmed Rebai	Professeur **(Chef de l'équipe)**
Hammadi Ayadi	Professeur
Sami Aifa	Professeur
Saber Masmoudi	Professeur
Hassen Hadj Kacem	Maitre de Conférences
Najla Kharrat	Maitre-assistante «MA »
Sami MNIF	MA
Mariem BEN SAID	MA
Imen AYADI	MA
Salima BELGUITH MAALEJ	MA
Imen BENREBEH	MA
Leila AYADI	MA
Boutheina CHERIF	MA
Heni BOUHAMED	Assistant « A »
Lobna BOUCHAALA	A
Ikram JEMAL	A
Rayda Ben Ayed	Post Doctorant
Aissette Baanannou	Post Doctorant
Yosra Souiden	Post Doctorant
Soumaya Triki	Post Doctorant
Chakchouk Imen	Doctorante « D »
Faten Rmida	D
Sabrine Ben Mabrouk	D

Afef ElAyeb	D
Karim Jellali	D
Rihab Kallel	D
Faten Abdelli	D
Hela Gargouri	D
Amna Ayadi	D
Rania Ammar	D
Rania Abdelhedi	D
Amel Louhichi*	D
Jihène Elloumi*	D
Mariem Moalla	Mastère

* : étudiantes en fin de thèse ayant épuisé leurs dérogations et s'inscriront uniquement pour la soutenance

Conception de biopuces bicolores permettant le dépistage simultané de mutations décrites dans les pays d'Afrique du Nord

Depuis 2010, notre travail a consisté à optimiser les différents paramètres de production de biopuces tels que la conception de sondes oligonucléotidiques, la chimie de couverture de la surface d'impression, le type de liaison surface-oligonucléotide, la méthode d'impression de sondes et le type de marquage des ddNTPs.

La première étape dans notre travail de conception de puces a consisté à maitriser le choix de sondes oligonucléotiques. Ces oligonucléotides sont conçus pour se prolonger d'une paire de bases dans les séquences de type sauvage et muté, sauf en présence de délétions ou d'insertions et où le même nucléotide est prévu dans les séquences de type sauvage et muté. Dans de tels cas, des oligonucleotides sont conçus pour s'étendre plus loin dans la délétion ou l'insertion. En présence d'épingles à cheveux dans les séquences des deux sondes sens et antisens, des changements de séquence interne ont été faits pour empêcher la formation de ces structures et réduire l'auto-complémentarité de la sonde sans affecter l'hybridation et la réaction d'extension.

Les oligossondes ont été testées à 3 concentrations dans différents tampons et en utilisant pour impression 3 spotteurs avec et sans contact (*Genetix Q-Array, Nanoplotter et Scienion). Par*

ailleurs, nous avons essayé des lames avec différentes couvertures en aminosilane, epoxysilane, 2D et 3D aldéhyde. Après plusieurs essais, nous avons retenu la concentration de 50 µM dans le tampon phosphate. Nous avons également retenu deux substrats, l'Epoxysilane et l'Aldehydesilane (SCHOTT, Germany), pour couvrir les lames utilisées pour la fabrication de biopuces.

À l'extrémité 5' de chaque sonde, nous avons ajouté un groupement amine et un espaceur de 6 ou 12 atomes de carbones. Le groupement amine est nécessaire pour assurer la fixation covalente des sondes oligonucléotidiques sur la surface de la lame en verre, et la chaîne des atomes de carbone permet de surmonter les problèmes d'encombrements stériques liés à la liaison de l'ADN cible aux sondes oligonucléotidiques. Les intensités des spots des mêmes sondes avec les différents espacers n'ont pas montré de différence significative. La particularité de notre puce pour miniséquençage est l'utilisation seulement de 2 fluorescences Cyanines 3 et 5, qui sont compatibles avec différents types de scanners. Deux types de combinaisons de marquage des ddNTP ont été choisis pour pouvoir cribler toutes les mutations sur la puce.

Puce pour le diagnostic de surdité

Une combinaison de 12 PCRs multiplexes a été mise au point de façon à amplifier 35 fragments portant 58 mutations sur 21 gènes. Les conditions d'amplification des différents amplicons sont identiques ce qui facilite énormément le travail en utilisant des plaques de 96 puits. La spécificité des sondes a été initialement optimisée en utilisant 103 échantillons d'ADN de génotypes connus dont 101 échantillons possèdent une ou plusieurs mutations responsables de surdité, donc ils représentent des contrôles positifs, et les deux autres échantillons sont dépourvus de toute mutation donc ils représentent des contrôles négatifs. La présence ou l'absence de mutations homozygotes et/ou hétérozygotes responsables de surdité dans ces échantillons ont été d'abord confirmées par séquençage de Sanger. Une concordance parfaite a été trouvée entre les résultats obtenus par séquençage Sanger et celles du test de la puce moyennant les sondes oligonucléotidiques conçues.

Une Validation à l'aveugle des sondes conçues a été aussi effectuée en analysant les ADNs de 48 sourds. Des allèles mutants ont étés trouvés chez 13 échantillons. Les résultats obtenus sont vérifiés par le séquençage Sanger. Pour les 35 échantillons restants, aucune mutation figurant dans la puce conçue n'a été trouvée. Il existe obligatoirement de nouvelles mutations responsables de surdité. Cela a été confirmée chez deux cas où l'utilisation du séquençage haut

débit d'exomes, nous a permet de détecter une novelle mutation dans le gène *COL11A2* et identifier le nouveau gène *DCDC2*. Nous envisageons d'inclure ces mutations dans notre puce suite aux étapes de désignation de sondes et de validation.

Ces travaux ont fait l´objet de trois articles récemment publiés. Notre puce et notre étude de localisation du gène *DCDC2* dans les neuromastes du poisson zèbre ont fait la couverture des prestigieuses revues « *Journal of Molecular Diagnostics* » et « *Human Molecular Genetics* »

Développement et criblage des antagonistes aux ErbBs en cancer

Dans un précédent travail, nous avons essayé d'établir un kit de criblage des TKIs (tyrosine kinase inhibitor) grâce à la production du domaine intracellulaire d'EGFR chez *E.coli*. En plus, nous avons sélectionné les disques de betterave développant des galles d'*Agrobactérium tumefaciens* comme un système de pré-criblage des molécules actives contre les tumeurs humaines. Ces deux systèmes ont montré leur efficacité en testant la génistéine (TKI commercial) pour le criblage *in vitro* et confirmé l'activité antitumorale sélectionnée sur les disques de betterave de certains dérivés ferrocéniques du tamoxifène.

Dans cette partie de notre travail a concerné le ciblage de la voie de signalisation principale des ErbBs à savoir la MAP kinase. Pour ce faire, nous avons essayé l'activité d'un antagoniste de l'estradiol qui le clomifène citrate sur les lignées de cancer de sein : MCF-7 (récepteur d'estrogéne positive) et BT20 (récepteur d'estrogène négative). Nous rappelons dans ce contexte que le récepteur d'estrogène est l'homologue cellulaire de la protéine ErbA du virus d'éryhtroblastose contenant l'erbB (oncogène homologue d'EGFR) et qu'erbA potentialise l'action d'erbB. Il a été montré que le récepteur d'estrogène potentialise l'action d'EGFR en activant l'expression des facteurs de croissance : les ligands de la famille d'EGFR. Notre présent travail a confirmé l'effet proliferatif de l'estradiol tout en montrant l'effet antiproliferatif du clomifène citrate ayant un potentiel anti-tumoral en induisant l'apoptose de deux lignées du cancer de sein utilisées.

Le test de la voie MAP kinase nous a permis de découvrir que la phosphorylation d'Erk est associée aussi à l'induction d'apoptose et n'est associée à la prolifération cellulaire qu'en absence du récepteur d'estrogène (lignée BT20) Ceci nous a donné un cas de phosphorylation d'Erk en apoptose et en prolifération dans la lignée BT20. Nous avons publié ces travaux dans le journal « Journal of receptors and signal transduction ».

Pour confirmer ces résultats nous avons adopté un autre système à savoir l'effet antiproliferatif de trois antibiotiques sur la lignée du cancer colorectal LOVO. Ces molécules testées ont montré un effet

cytotoxique parfois associé à une apoptose mais ont révélé un comportement différent vis-à-vis la phosphorylation d'Erk parfois induction parfois réduction.

C'est ainsi, nous avons confirmé que le dogme associant l'activation de la MAP kinase à la prolifération cellulaire n'est pas toujours vérifié nous avons même des exemples d'association entre mort cellulaire et phospho-Erk Ces résultats ont fait l'objet d'une aotre publication dans « journal of receptors and signal transduction ». De même, Mme Jihene Elloumi a pu soutenir sa thèse de Génie Biologique basée sur ces résultats en Mars 2015.

Microorganismes endophytes comme sources de biomolécules actives;

Les micro-organismes endophytes sont mutualistes des plantes. Ils sont impliqués dans la protection contre les agents pathogènes (microbes et insectes) par la production de métabolites secondaires doués d'activités biologiques intéressantes. Dans ce contexte, l'année 2014 a été consacré au criblage des microorganismes endophytes producteurs de molécules présentant des activités biologiques intéressantes. 65 microorganismes endophytes, répartis en 57 souches fongiques et 8 souches bactériennes, ont été isolés à partir des feuilles de différentes plantes médicinales de la région de Sfax (*Liquidambar orientalis*, *Ceratonia siliqua* L., *Jasminum officinale*, *Cupressus sempervirens* ...etc). La pureté de ces microorganismes a été confirmée par des observations microscopiques suite à des repiquages successifs sur un milieu de culture solide. Nous nous sommes intéressés à la recherche d'activités antibactérienne et antioxydante des différents métabolites secondaires produits par ces microorganismes et récupérés par extraction avec l'acétate d'éthyle. La plupart des extraits présente des activités biologiques intéressantes. L'étude de l'activité antibactérienne est réalisée par la méthode de micro-dilution sur milieu liquide. Les résultats ont révélé que les extraits 2(a), 4(O) et 5(C) sont les meilleurs extraits présentant les activités inhibitrices et bactéricides les plus importantes pour la majorité des bactéries testées. La souche Gram positif *Bacillus subtilis* est la souche la plus sensible à l'activité inhibitrice des extraits, suivie par la souche *Staphylococcus aureus*. Le potentiel antioxydant des extraits a été évalué par la méthode d'inhibition du radical libre DPPH. Les extraits 5(A) et 1(T) sont dotés d'un pouvoir antioxydant élevé en présentant des IC_{50} de l'ordre de 0,389 et 0,955 µg ml^{-1}, respectivement, inférieurs à celle de la molécule de référence BHT. L'essai de caractérisation des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) a permis de déduire que certains extraits sont des mélanges de molécules qui peuvent être des peptides, des polyphénols et/ou des flavonoïdes. Dans la suite du travail, nous allons purifier les biomolécules présentes dans ces extraits, élucider leurs structures et étudier leurs activités biologiques;

3. Autres projets

3.1. Traçabilité et authenticité des huiles d'olives en Tunisie

La traçabilité et l'authentification des huiles d'olive constituent aujourd'hui un enjeu économique majeur pour le secteur oléicole; les marqueurs moléculaires constituent dans ce cadre un outil de choix. Dans un travail précédent nous avons génotypé les ADN extraits à partir d'huile d'olive de 22 variétés pour 8 marqueurs SSR et nous avons ont montré qu'il était possible avec trois marqueurs seulement, génotypés de manière séquentielle, de déterminer l'origine variétale d'une huile d'olive monovariétale. Nous avons ensuite essayé de valider ce choix et étudier la sensibilité de la procédure sur des huiles commerciales inconnues et des mélanges d'huiles de variétés différentes. Il s'est avéré qu''un mélange de deux huiles dans une proportion de l'huile minoritaire inférieur à 10%. Nous avons développé comme outil de support une base de données permettent à tout utilisateur de déterminer la variété à partir d'un profil génotypique saisi par l'utilisateur. Cette base est hébergée sur le site http://www.bioinfo-cbs.org/ogdd . Nous avons ensuite attaqué le problème de l'authenticité des huiles d'olives en essayant de développer les mélanges frauduleux avec d'autres huiles végétales moins nobles en utilisant des marqueurs spécifiques d'espèces.

3.2. Bioinformatique

Deux projets principaux en bioinformatique ont été réalisés et portent l'un sur l'identification à l'échelle des protéomes de l'importance des motifs de type cluster de résidus chargés dans la signalisation et la recherche de potentielles cibles thérapeutiques et l'autre sur la modélisation des réseaux biologiques. Ce dernier constitue un axe majeur et ancien de l'équipe bioinformatique sur les modèles graphiques probabilistes et en particulier sur les réseaux Bayesiens et leur utilisation dans l'analyse des grandes données (Big Data) issues de la génomique (études d'association pangénomique) et du Next Generation Sequencing (NGS).

Tableau récapitulatif des activités

Articles	Thèses en cours	Participations congrès	Mastère soutenue	Thèses soutenues	Manifestations organisées
24	14	5	2	2	2

Publications Scientifiques

1. Ben-Ayed R, Sans-Grout C, Moreau F, Grati-Kamoun N, Rebai A. 2014. Genetic Similarity Among Tunisian Olive Cultivars and Two Unknown Feral Olive Trees Estimated Through SSR Markers. *Biochem Genet*. 52: 258-68.
2. Bouhamed H., Masmoudi A, Lecroq T, Rebai A. 2014. Reducing the Structure Space of Bayesian Classifiers Using some General Algorithms. *J Math Model Algor Oper Res*. 1: 41
3. Elloumi-Mseddi J, Jellali K, Villalobo A, Aifa S. A premature termination of human epidermal growth factor receptor transcription in Escherichia coli. *Scientific World Journal*. 830923.
4. Jemel-Oualha I, Elloumi-Mseddi J, Beji A, Hakim B, Aifa S. Controversial effect on Erk activation of some cytotoxic drugs in human LOVO colon cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 1-5.
5. Siala O, Rebai A, Fakhfakh F. 2014. Slight variations in the SC35 ESE sequence motif among human chromosomes: a computational approach. *Gene.* 545: 102-110.
6. Hamad MB, Marzouk S, Kaddour N, Masmoudi H, Fakhfakh F, Rebai A, Bahloul Z, Maalej A. 2014. Anticyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor in south Tunisian patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and severity. *J Clin Lab Anal*. 28: 21-26.
7. Khlifi R, Olmedo P, Gil F, Feki-Tounsi M, Hammami B, Rebai A, Hamza-Chaffai A. 2014. Biomonitoring of cadmium, chromium, nickel and arsenic in general population living near mining and active industrial areas in Southern Tunisia. *Environ Monit Assess*. 186: 761-779.
8. Khlifi R, Olmedo P, Gil F, Feki-Tounsi M, Hammami B, Rebai A, Hamza-Chaffai A. 2014 Risk of laryngeal and nasopharyngeal cancer associated with arsenic and cadmium in the Tunisian population. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21: 2032-42.
9. Khlifi R, Kallel I, Hammami B, Hamza-Chaffai A, Rebai A. 2014 DNA repair gene polymorphisms and risk of head and neck cancer in the Tunisian population. *J Oral Pathol Med. 43: 217-224*

10. Zribi A, Jabeur H, Aladedunye F, Rebai A, Bertrand M, Bouaziz M. 2014. Monitoring of Quality and Stability Characteristics and Fatty Acid Compositions of Refined Olive and Seed Oils during Repeated Pan- and Deep-Frying Using GC, FT-NIRS and Chemometrics. *J Agric Food Chem. 62: 10357-67*

11. Lasram K, Ben Halim N, Hsouna S, Kefi R, Arfa I, Ghazouani W, Jamoussi H, Benrahma H, Kharrat N, Rebai A, Ben Ammar S, Bahri S, Barakat A, Abid A, Abdelhak S. 2014. Evidence for association of the E23K variant of KCNJ11 gene with type 2 diabetes in Tunisian population: population-based study and meta-analysis. *Biomed Res Int. 265-274*

12. Feki-Tounsi M, Khlifi R, Mhiri MN, Rebai A, Hamza-Chaffai A. 2014. Cytogenetic damage in the oral mucosa cells of bladder cancer patients exposed to tobacco in Southern Tunisia. *Environ Sci Pollut Res Int. 21: 12922-7*

13. Khlifi R, Ben Salah G, Chakroun A, Hamza-Chaffai A, Rebai A. 2014. Inter-ethnic differences in genetic polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes (CYP1A1, CYP2D6, NAT1 and AT2) in healthy populations: correlation with the functional in silico prediction. *Mol Biol Rep. 41: 5735-43.*

14. Feki-Sahnoun W, Hamza A, Mahfoudi M, Rebai A, Hassen MB. 2014. Long-term microphytoplankton variability patterns using multivariate analyses: ecological and management implications. *Environ Sci Pollut Res Int., 19: 11481-99.*

15. Feki-Tounsi M, Olmedo P, Gil F, Mhiri MN, Rebai A, Hamza-Chaffai A. 2014. Trace metal quantification in bladder biopsies from tumoral lesions of Tunisian cancer and controls subjects. *Environ Sci Pollut Res Int. 2014, 19:11433-8*

16. Jabeur H, Zribi A, Makni J, Rebai A, Abdelhedi R, Bouaziz M. 2014. Detection of Chemlali extra-virgin olive oil adulteration mixed with soybean oil, corn oil, and sunflower oil by using GC and HPLC. *J Agric Food Chem. 62:4893-4904*.

17. Louati R., Abdelmoula N.B.·, Trabelsi I., Abid D., Lissewski C., Kharrat N, Kamoun S., Zenker M., Rebai T. 2014. Clinical and Molecular Findings of Tunisian Patients with RASopathies. *Molecular Syndromology*, 5: 212-217.

18. Elloumi-Mseddi J, Jemel-Oualha I, Beji A, Hakim B, Aifa S. Effect of estradiol and clomiphene citrate on Erk activation in breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 1-5.

19. El Arbi M, Théolier J, Pigeon P, Jellali K, Trigui F, Top S, Aifa S, Fliss I, Jaouen G, Hammami R. Antibacterial properties and mode of action of new triaryl butene citrate compounds. *Eur J Med Chem*. 76:408-13.

20. Hammami K, Elloumi J, Aifa S, Drouet C, and El Feki H. (2014) Synthesis and characterization of hydroxyapatite ceramics organofunctionalized with ATP (adenosine triphosphate). *Journal of Advances in Chemistry 9: 1787-1797.*

21. A. Chebbi, S. Mnif, N. Mhiri, L. Jlaiel, S. Sayadi, M. Chamkha. (2014) A moderately thermophilic and mercaptan-degrading Bacillus licheniformis strain CAN55 isolated from gas-washing wastewaters of the phosphate industry, Tunisia. *International Biodeterioration & Biodegradation* 94, 207-213.

22. A. Zayen, S. Mnif, L. Jlaeïl, M. Bouaziz, S. Sayadi. (2014) Phthalates accumulation inside an anaerobic membrane bioreactor for landfill leachate treatment. *Desalination and Water Treatmen*t 1-8.

23. S. Mnif, S. Sayadi, M. Chamkha. (2014) Biodegradative potential and characterization of a novel aromatic-degrading bacterium isolated from a geothermal oil field under saline and thermophilic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation 86, 258-264.*

24. F.Z. Ferradji, S. Mnif, A. Badis, S. Rebbani, D. Fodil, K. Eddouaouda, S. Sayadi. (2014) Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing Streptomyces spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration & Biodegradation 86, 300-308.*