MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



RAPPORT D'ACTIVITES DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX ANNEE 2015

TABLE DES MATIERES

1-	Introduction	2
2-	Présentation générale du CBS	3
3-	Effectif du CBS	3
4-	Liste des Enseignants Chercheurs / Ingénieurs du CBS	4
5-	Membres du Conseil Scientifique	5
6-	Budget du CBS	6
7-	Equipements lourds du CBS	7
8-	Service maintenance	7
9-	Coopération Internationale	7
10-	Ouverture sur l'environnement	8
11-	Production Scientifique	10
12-	Unité d'Information et de Documentation Scientifique	11
13-	Journées scientifiques	11
Pré	sentation des Laboratoires de recherhe, Unités et services communs du CBS	12
•	LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)	13
•	LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME)	24
•	LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB)	39
•	LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes (LBAP)	49
•	LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB)	62
•	LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE)	73
•	LR15CBS07 : Laboratoire de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire (LPCMC)	82
•	US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches (UVRR)	93
	Service Analyse	104

1) Introduction:

La Tunisie a considéré depuis les années 80 que les biotechnologies constituent un axe potentiel important de développement. Elle a non seulement restructuré certaines institutions de recherche pour répondre à ces objectifs mais créé d'autres structures et surtout mis en place des technopoles dédiées aux biotechnologies et aux biotechnologies appliquées aux domaines de l'agroalimentaire, l'eau, l'énergie et l'environnement marquant ainsi une volonté politique très forte de développement de ces technologies.

La Tunisie détient, ainsi, des atouts indéniables dans ce secteur grâce au personnel scientifique disponible (chercheurs statutaires répartis dans les structures de recherche du système national de recherche, chercheurs dans les formations doctorales, etc.). Ces ressources humaines ont contribué de manière significative aux acquis obtenus grâce à la mise en place d'une politique nationale en matière de recherche scientifique et technologique comme par exemple la reconnaissance internationale des activités de recherche (la Tunise est aujourd'hui pays associé dans le programme H2020), le nombre et la qualité des publications des laboratoires de recherche, les différents « produits » obtenus au sein des différentes structures de recherche, etc..

Le CBS participe activement au développement de la recherche scientifique dans le domaine des biotechnologies au service de la production et du développement économique. Au cours du dernier contrat programme 2010-2013, le CBS a renforcé son réseau de coopération internationale. Ainsi à partir de 2010, le CBS a coordonné 6 projets multilatéraux de l'Union Européenne FP7 (BioNexGen, Bioprotech, Clara, WaterBiotech, Waterusemed, Cinea). Le CBS a coordonné un projet Tuniso-Japonais JICA/JST avec l'Université de Tsuluba sur la valorisation des bioresources du milieu aride et semi-aride pour un développement régional en Tunisie. Le CBS assure une production scientifique en nette évolution (plus de 420 publications internationales à haut facteur d'impact pour la période de 2010 à 2013 par un nombre de chercheurs compris entre 40 et 50) ainsi qu'une formation doctorale de qualité. Concernant la relation avec le milieu socio-économique, le CBS a contracté quelques conventions mais sa prestation reste en deçà des capacités réelles du Centre.

Lors de l'évaluation de son contrat programme 2010-2013, le CNEARS a confirmé le statut du CBS en tant que centre d'excellence mais à incité les chercheurs du CBS à mieux valoriser leurs travaux de recherche et à dynamiser sa pépinière d'entreprise.

Le CBS a signé son nouveau contrat programme de 4 ans le 22 Mai 2015. Le CBS à travers ses 7 nouveaux laboratoires est en train d'explorer de nouveaux projets/partenariats dans les domaines du méta-génomique, la lutte biologique, la bio-raffinerie des micro-algues, l'amélioration des plantes au stress hydrique, le développement des bio-puces dans les secteurs agro-alimentaires et pharmaceutiques, etc. Il compte également renforcer son expertise dans les domaines de technologie de l'ADN, des bioprocédés, de l'up-scaling et des techniques analytiques avancées par l'inscription dans une démarche de certification et d'accréditation.

2) Présentation générale du CBS :

Le Centre de Biotechnologie de Sfax est composé de Sept laboratoires de recherche, une unité spécialisée (valorisation des résultats de la recherche), une administration (ressources humaines, finance), des services communs (informatique et logistique, analyse et maintenance.), 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 2015:

Ce rapport d'activités se rapporte aux activités des différentes structures de recherche du CBS durant l'année 2015 (la 1^{ère} année du contrat programme signée **le 22 Mai 2015 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 7 Laboratoires de Recherche et une Unité Spécialisée :

LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux	(LBPE)
LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes	(LBME)
LR15CBS03 : Laboratoire de Biopesticides	(LB)
LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes	(LBAP)
LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules	(LMB)
LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes	(LBMIE)
LR15CBS07 : Laboratoire de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire	(LPCMC)
US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches	(UVRR)

3) Effectif du CBS:

Année	2015
Enseignants Chercheurs	53
Corps Technique	64
Administratifs + ouvriers	40
Effectif Total	157

4) 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			
Ali Faouzi Gargouri	Professeur / Directeur d'un laboratoire			
Hammadi Ayadi	Professeur			
Raja Mokdad	Professeur			
Ahmed Rebaï	Professeur / Directeur d'un laboratoire			
Hafedh Belghith	Professeur responsable du service analyse			
Abdelhafidh Dhouib	Professeur			
Lotfi Mellouli	Professeur / Directeur d'un laboratoire			
SlimTounsi	Professeur / Directeur d'un laboratoire			
SabeurMasmoudi	Professeur			
Mohamed Sami Aïfa	Professeur			
Mohamed Chamkha	Professeur			
Hichem Chouayakh	Professeur			
Souad Rouis	Maître de conférences			
Mamdouh Ben Ali	Maître de conférences			
Faiçal Brini	Maître de conférences / Directeur d'un laboratoire			
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			
Fatma Karray	Maître Assistant			
Rayda Zribi	Maître Assistant			
Héla Trigui	Maître Assistant			
Sonia Khoufi	Maître Assistant			
Mariem Ellouz	Maître assistant			
Ines Yaacoubi	Maître assistant			
Wajdi Ayadi	Maître assistant			
Najla Kharrat	Maître assistant			
Houda Skouri	Maître Assistant			
Olfa Frikha	Maître Assistant			
Mouna Choura	Maître Assistant			
Walid Saïbi	Maître Assistant			
Mohamed Guerfali	Maître Assistant			
Sami Mnif	Maître Assistant			
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 Assistante			
Nedia Zaari	Maître Assistante Maître Assistante			
Raja Lakhal	Maître Assistante			
Dorra Abdelmalek	Maître Assistante			
Mohamed Ali Mesrati	Maître Assistant			
Ikram Zaidi	Maître Assistante			

Slim Smaoui	Assistant			
Manel Hamza	Technologue			
Firas Feki	Ingénieur Général			
Ilem Hassaïri	Ingénieur Général / Directeur Unité Spécialisée			
Fathi Aloui	Ingénieur en chef			
Ines karray	Ingénieur en chef			
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			
Mounir Bouattour	Ingénieur Principal			
Malika Ayadi	Ingénieur Principal			
Abdallah Choura	Ingénieur Principal			

NB: Le CBS compte aussi: 34 techniciens; 03 Préparateurs et 07 agents techniques

5) Membres du Conseil Scientifique

Sami Sayadi Directeur Général du CBS, Abdallah choura Secrétaire général et rapporteur Directeur de laboratoire, Membre Ali Gargouri Faical Brini Directeur de laboratoire, Membre Slim Tounsi Directeur de laboratoire, Membre Directeur de laboratoire, Membre Lotfi Mellouli Samir Bejar Directeur de laboratoire, Membre Ahmed Rebai Directeur de laboratoire, Membre Ilem Hsairi Directeur Unité Spécialisée, Membre Mohamed Chemkha Représentant du corps A, Membre Mohamed Sami Aifa Représentant du corps A, Membre Kais Jammousi Représentant du corps A, Membre Sami Mnif Représentant du corps B, Membre Raida Zgal Représentant du corps B, Membre Ines Yacoubi Représentant du corps B, Membre Fathi Aloui Représentant des ingénieurs Représentant des ingénieurs Riadh Ben Marzouk

Représentants des domaines socio-économiques

Abdessattar Toumi (DG CNCC)
 Labid Ghodbani (PDG SNCPA)
 Omar LABIDI (DCentral GCT)
 Lassad Boujbal (DG MEDIS)

- Hechmi Louzir (DG Institut Pasteur)

Zied Borji (DG CTAB)Abdelmajid Hamouda (DG ANGED)

6) Budget du CBS:

	Titre I: 475.200,000
	Titre II: 800.000,000
Budget Provenant du Ministère en DT	Equipement scientifique: 290.000,000
	Equipement administratif: 0.000,000
Secteur Economique National et International	81.888,849 DT
Coopération Internationale:	
1/Projets Multilatéraux (*)	89.925,571 DT
2/Organismes internationaux :ICGEB.	13.882 ,741 DT
3/ Projets bilatéraux : (**)	136.100,000 DT
Coopération Internationale (Total)	239.908,312 DT
Total resources (secteur économique et coopération)	321.797,161 DT

^(*) Projets Européen FP7 de l'UE (Bionexgen et Waterbiotech), géré par l'Agence Nationale de Promotion de la Recherche Scientifique du Ministère « ANPR » et Le projet LMI Laboratoire Mixte International COSYS-Med sous tutelle de l'IRD.

7) Equipements Lourds du CBS:

Désignation	Date d'acquisition	Bénéficiaire	
Fermenteur 300 L	1983	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche	
Sequenceur d'acide Nucléique	2003	Service d'analyse	
Molécular Imager	2003	Service d'analyse	
Système de Chromatographie HPLC Préparative	2003	Service d'analyse	
Ultra Centrifugeuse	2003	Service d'analyse	
Spetrometre de masse couplé LC/MS/MS	2003	Service d'analyse	
Microscope Confocale	2006	Service d'analyse	
Système Bidimentionnel	2006	Service d'analyse	
Système de Chromatographie Gaz Liquide	2006	Service d'analyse	
Centrifugeuse Continue	2007	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche	
Scanner Micro puce	2009	Service d'analyse	
Fermenteur 1000 L + 100 L	2009	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche	
Fermenteur 20 L	2011	LMB	
GMSMS	2011	LBPE	
HPLC	2011	LBPE	
système de Scequencage HD	2013	Service d'analyse	
Chaudière a vapeur	2013	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche	

^(**) Projets DGRS/CNRS et PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française; projet relevant de la coopération Tuniso- Sud-Africaine et projet relevant de la coopération Tuniso-Coréenne.

8) Service de Maintenance :

Durant l'année 2015, le service a 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.
- L'assistance, le suivi et le contrôle de tous les travaux de sous-traitances de maintenances des appareils et des équipements
- L'acquisition des équipements scientifiques.
- Application du programme de la réduction de la consommation d'énergie, la réduction de consommation.

9) Coopération Internationale:

Type de la Coopération	Nombre de Projets
Multilatérale	2
Bilatérale	8
Organisme International	1

a/Coopération Multilatérale

Durant l'année 2015, Le CBS a été impliqué dans un nouveau projet dans le secteur des Biotechnologies Environnementales dans le cadre du Laboratoire Mixte International COSYS-Med sous tutelle de l'IRD et a continué à entretenir 1 projet multilatéral relevant du 7éme PCRD de l'union Européenne « **CINEA** » dédié à la Coopération Euro-méditerranéenne pour le développement de l'innovation et l'exploitation dans le domaine de l'Agroalimentaire.

b/ Coopération Bilatérale

Le CBS a été impliqué durant l'année 2015 dans 3 nouveaux Projets dont 2 de coopération universitaire Tuniso-Française **PHC-UTIQUE** et 1 projet de coopération **Tuniso-Sud-Africaine** et a continué à entretenir 5 autres projets dans le cadre de la coopération Tuniso-Française (3); coopération Tuniso-Coréenne (1); et Tuniso-Algérienne (1)

c/ Organismes internationaux

Durant l'année 2015, a continué sa collaboration avec le Centre International de Génie Génétique et de Biotechnologie **ICGEB** dans le cadre des projets CRP-ICGEB.

10) Ouverture sur l'environnement socioéconomique national et international:

Durant l'année 2015 le CBS a noué une nouvelle convention à l'échelle internationale avec la société Française **Ovalie innovation** et a continué sa collaboration avec l'industriel Français **ADISSEO** et la société d'Etudes et d'Aménagement des Côtes Nord de la Ville de Sfax **SEACNVS** dans le secteur de l'environnement. Par ailleurs, le CBS a réalisé durant 2015

un bon nombre de prestations et de services (analyses) au profit de partenaires académiques et socio-économiques.

A/ Liste des invités étrangers :

Nom et Prénom Nom du Labo/ Projet		Pays	Durée
Abdelghani Sawsan	Tuniso / Egyptien	Egypte	Du 22 au 27 avril
Lachuer Joel	CBS	France	Du 20 au 23 juillet
Aoyi Ochieng	Tuniso / Afrique de sud	Afrique du sud	Du 29 octobre au 07 novembre
Tumisang Gerald Seodigeng	Tuniso / Afrique de sud	Afrique du Sud	Du 29 octobre au 07 novembre
Osifo Peter ogbemudia	Osifo Peter ogbemudia Tuniso / Afrique de sud		Du 29 octobre au 07 novembre
Harmand Jérome	PHC-Utique	France	Du 23 au 27 novembre
Battimelli Audrey	Battimelli Audrey PHC-Utique		Du 23 au 27 novembre
Godon Jean-Jacques	acques PHC-Utique		Du 12 au 21 décembre
Abdel Mlak Bedis	Abdel Mlak Bedis Tuniso / Algérien		Du 15 au 19 décembre
Gales Amandine PHC-Utique		France	Du 16 au 20 décembre
Rhimi Moez	Rhimi Moez PHC-Utique		Du 18 au 29 décembre
Virole Marie-Joelle	PHC-Utique	France	Du 18 au 29 décembre

B/ Missions à l'Etranger :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Ayadi Hammadi	Bioprotech	Espagne	Du 20 au 23 janvier
Ayadi Hammadi	Bioprotech	Belgique	Du 25 au 30 janvier
Tounsi Slim	LPAP	France	Du 08 au 14 février
Sayadi Sami	IRD	France	Du 11 au 15 février
Kharat Najla	LMB	Maroc	Du 15 au 20 février
Ayadi Hammadi	Bioprotech	France	Du 05 au 09 avril
Sayadi Sami	IRD	France	Du 06 au 11 avril
Sayadi Sami	CINEA	Algérie	Du 19 au 24 avril
Ayadi Hammadi	Bioprotech	Maroc	Du 03 au 08 mai
Sayadi Sami	CBS	Iran	Du 17 au 22 mai
Jawedi Bassem	PHC-Utique	Turquie	Du 20 au 23 mai
Sayadi Sami	Organisme étranger	France	Du 25 au 30 mai
Jawedi Bassem	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 25 mai au 05 juin
Chouayakh Hichem	Organisme étranger	Portugal	Du 31mai au 06 juin
Marrakchi Nadia	Bioprotech	France	Du 08 au 12 juin
Yakoubi Ines	Tuniso / Coréen	Corée du sud	Du 08 au 16 juin
Ayadi Hammadi	Bioprotech	France	Du 17 au 22 juin
Guerfeli Mohamed	LVBPPE	France	Du 21 au 28 juin
Tounsi Slim	LPAP	Espagne	Du 20 au 26 juillet
Sayadi Sami	Organisme étranger	France	Du 21 au 24 juillet
Sayadi Sami	CINEA	Autriche	Du 23 au 26 aout
Khoudi Habib	LBPE	Egypte	Du 23 au 26 aout
Rouis Souad	LPAP	France	Du 30 aout au 05 septembre
Ben Ali Mamdouh	LBPE	France	Du 01 au 07 septembre

Khoufi Sonia LBPE		Turquie	Du 01 au 07 septembre	
			Du 05 au 10 septembre	
Ayadi Hammadi Bioprotech		Autriche	•	
Sayadi Sami PHC-Utique		France	Du 06 au 13 septembre	
Chamkha Mohamed	PHC-Utique	France	Du 06 au 13 septembre	
Aloui Fathi	LBPE	Allemagne	Du 06 au 10 septembre	
Tounsi Slim	LPAP	Allemagne	Du 06 au 10 septembre	
Rouis Souad	LPAP	Allemagne	Du 06 au 10 septembre	
Ayadi Hammadi	Bioprotech	Malte	Du 29 septembre au 03	
Rouis Souad	Organisme étranger	France	Du 05 au 08 octobre	
Banannou Isset	LPCMC	Allemagne	Du 12 octobre au 30	
Sayadi Sami	CINEA	Maroc	Du 20 au 24 octobre	
Rouis Souad	Organisme étranger	Espagne	Du 29 au 31 octobre	
Ayadi Hammadi	Bioprotech	Hongrie	Du 03 au 08 novembre	
Khoufi Sonia CMCU		France	Du 09 au 15 novembre	
Feki Firas	CMCU	France	Du 09 au 15 novembre	
Tounsi Slim	LBPES	Algérie	Du 10 au 13 novembre	
Trigui Mohamed	LBPES	Algérie	Du 10 au 13 novembre	
Ayadi Hammadi	TEMPUS	France	Du 22 au 28 novembre	
Ben Salah Riadh	LMB	Espagne	Du 23 au 30 novembre	
Rebai Ahmed	Organisme étranger	Arabie	Du 23 novembre au 04	
Gargouri Ali	PHC-Utique	France	Du 29 novembre au 03	
Gargouri Raja	PHC-Utique	France	Du 29 novembre au 03	
Gargouri Ali	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 04 au 08 décembre	
Belghith Hafedh Tuniso / Algérier		Algérie	Du 04 au 08 décembre	
Hssairi Ilem	CINEA	Espagne	Du 08 au 11 décembre	
Sami sayadi	CINEA	Espagne	Du 04 au 12 décembre	
Ayadi Hammadi	Bioprotech	Emirats	Du 13 au 16 décembre	
Gargouri Ali	LBME	France	Du 14 au 18 décembre	
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				

C/ stages à l'Etranger :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Karray Raida	LBPE	Italie	Du 01 février au 30 mars
karaa Aïcha	PHC-Utique	France	Du 22 février au 21 mars
Jbeli Ahlem	NEWTECK	France	Du 15 mars au 15 mai
Mahjoubi Habib	CMCU	France	Du 01 avril au 30 mai
Triki Mouna	LVBPPE	France	Du 01 avril au 31 juillet
Ebel Chantal	LPAP	France	Du 02 avril au 11 avril
Mkaouar Hela	LVBPPE	France	Du 15 avril au 30 juin
Jmal Rania	CMCU	France	Du 15 avril au 15 juin
Tounsi Sana	LPAP	France	Du 15 avril au 15 juillet
Hwas Mokhless	Euromed 3+3	France	Du 01mai au 30 septembre
Ammeri Rihab	Lesaffre international	France	Du 04 mai au 12 juin
Ammar Rania	Bioprotech	France	Du 15 mai au 15 juin

Ayadi Emna Zahra	Bioprotech	France	Du 15 mai au 15 juin
Kamoun Yosra	LVBPPE	France	Du 15 au 23 mai
Rekik Hatem	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 25 mai au 05 juin
Rmida Faten	CRP-ICGEB	Espagne	Du 09 au 23 juin
Chebbi Alif	NEWTECK	Angleterre	Du 01 juillet au 31 aout
Ayadi Emna Zahra	Bioprotech	France	Du 12 aout au 11 octobre
Henteti Dorra	CMCU	France	Du 01 septembre au 19 novembre
Hamdi Karama	CMCU	France	Du 07 septembre au 07 novembre
Belhoul Mouna	LMB	France	Du 15 septembre au 15 novembre
Ammous Nihel	PHC-Utique	France	Du 28 septembre au 30 décembre
Bouhaja Houda	Bioprotech	France	Du 01 octobre au 31 décembre
Feki Emna	CMCU	France	Du 01 octobre au 31 novembre
Ben Abdallah Dorra	LBPES	France	Du 01 octobre au 30 novembre
Maalej Emna	LBPE	Italie	Du 02 octobre au 30 novembre
Cheffi Mariem	CMCU	France	Du 15 octobre au 13 novembre
Boukid Fatma	CMCU	Italie	Du 15 octobre au 15 décembre
Choura Mouna	CMCU	France	Du 19 au 31 octobre
Ammous Nihel	PHC-Utique	France	Du 20 octobre au 20 décembre
Tounsi Slim	LMB	France	Du 20 octobre au 04 novembre
Rekik Hatem	LBMIE	France	Du 01 au 30 novembre
Ammar Rania	Bioprotech	France	Du 01 novembre au 31 décembre
Sayadi Sami	CBS	Corée du Sud	Du 12 au 28 novembre
Ben mabrouk Sabrine	LPCMC	France	Du 15 novembre 2015 au 14 janvier 2016
Kchaou Nessrine	CBS	France	Du 23 novembre au 07 décembre
Ayadi Wajdi	DGRS/CNRS	France	Du 23 novembre au 07 décembre
Taktak Awatef	LBME	Turquie	Du 27 au 30 novembre
Karray Fatma	LBPE	France	Du 01 au 15 décembre
Hwas Mokhles	CMCU	France	Du 13 au 31 décembre

11) Production Scientifique:

	2015
Articles, Revues Internationales	132
Brevets nationaux	6
Brevets internationaux	1
Doctorats et Habilitations Soutenus	17
Mastères	20
PFE	3

12) Unité d'Information et de Documentation Scientifique : Personnel de l'unité

- Mme ZINEDDINE Houria (ép.) KARAA conservateur de bibliothèque, responsable de l'unité d'information et de documentation scientifique.
- Mme YAHAWI Wassila: attaché d'administration
- Mme ELKAMEL Saida : ouvrier catégorie 8

Activités de l'unité

A fin de permettre aux chercheurs du centre ainsi qu'aux acteurs du tissu 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 dotée d'une bibliothèque numérique garantissant un environnement de recherche bibliographique favorable via les outils logistiques suivants :192.168.40.32/bibliotheque1

- Nombre d'ouvrages: 581 (classés par thèmes: classification décimale de Dewey)
- Nombre des périodiques récents: 27 titres
- Nombre de poste PC: 10 postes, et accès wifi pour les PC portable
- Les accès libre aux bases de données, exemple: Elsevier, Springer, Scopus, Springer protocols...

Des ressources électroniques accessibles à partir du site du CNUDST à travers l'adresse IP L'unité d'information et de documentation scientifique du Centre de Biotechnologie de Sfax met ses efforts pour réussir ses rôles.

13) Les journées scientifiques :

- 26^{éme} Congrés de l'association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) du 23 au 26 Mars 2015 à Monastir, Tunisie.
- **2.** Workshop sur le transfert technologique et la Propriété Intellectuelle le 14 Avril 2015 organisé au CBS, Tunisie.
- **3.** International Engeneering Sciences in Biotechnology and Medicine (IESBM 015) du 1 au 3 Mai à Monastir, Tunisie
- **4.** Journée d'information sur le programme-cadre de l'UE pour la recherche et l'innovation H2020 le 16 Octobre 2015 organiséeau CBS, Tunisie.
- **5.** Journées Internationales de Biotechnologie (JIB2015) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) du 20 au 24 Décembre 2015 à Djerba, Tunisie.

Présentation des Laboratoires de recherche, Unités et Services communs du CBS

LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)

مخبرالأساليب البيئية

Responsable: Pr. Sami SAYADI

Email: sami. sayadi@cbs.rnrt.tn

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

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 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.

Les objectifs généraux du Laboratoire sont les suivants :

- Approfondir les connaissances sur les processus de dégradation de la matière organique dans les biotopes anaérobies ou aérobies et mettre en œuvre des souches microbiennes (bactéries et champignons) à hautes potentialités biotechnologiques, pour le traitement et la valorisation d'effluents ou de résidus agro-industriels.
- Exploiter des activités microbiennes pour la biodégradation de plusieurs rejets urbains et industriels (margines, abattoirs, hydrocarbures, détergents...) ainsi que leur valorisation par la production de molécules à haute valeur ajoutée.
- Caractériser des microorganismes (bactéries, champignons), particulièrement ceux isolés des milieux extrêmes, moyennant les outils classiques et moléculaires, ainsi que leurs systèmes enzymatiques impliqués dans des réactions de bioconversion ou biodégradation et/ou d'autres biomolécules (biosurfactants...).

Les travaux réalisés durant l'année 2015 entrent dans le cadre de 5 projets, cités ci-dessous. Nous présentons dans ce rapport quelques exemples de bioprocédés développés pour le traitement et la valorisation d'effluents prioritaires en Tunisie.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Etude, conception et mise en œuvre de nouveaux procédés de digestion anaérobie qui permettent de réduire le recours aux carburants fossiles en fournissant une source d'énergie renouvelable (bio-gaz).
- L'isolement et la caractérisation sur les plans phénotypique et phylogénétique des bactéries hydrocarbonoclastes, à des températures et salinités variées.
- L'étude des potentialités biodégradatives des hydrocarbures, en particulier des structures complexes et plolyaromatiques, par les souches bactériennes sélectionnées.
- Les essais d'applications des biosurfactants produits en bioremédiation.
- Optimisation des conditions de culture des microalgues pour la production de biomasse, l'élimination des polluants organiques et minéreaux et l'enrichissement en molécules d'intérêt
- L'étude de la co-digestion anaérobie pour la valorisation énergétique et la stabilisation des déchets solides
- La valorisation agronomique des digestats de méthanisation des déchets solides
- Evaluer les possibilités de valorisation des sous-produits de l'industrie agro-alimentaire pour la production de molécules d'intérêt.

LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	Qualité	Nom et Prénom	Qualité
Sami Sayadi	Professeur	Najwa Mlaik	En post-doc
Abdelhafidh Dhouib	Professeur	Samah Sellami	En post-doc
Mohamed Chamkha	Professeur	Amal Zayen	En post-doc
Hatem Ben Ouada	Professeur (INSTM- Monastir)	Fatma Zili	En Thèse
Sonia Khoufi	M.A.	Nehla Mezhoud	En Thèse
Mariem Ellouze	M.A.	Manel Ben Abdallah	En Thès
Fatma Karray	M.A	Fatma HELAOUI	En Thèse
Hatem Zaghden	M.A	Fatma Hadrich	En Thèse
Zouhaier Bouallegui	M.A	Hanen Chaari Kharrat	En Thèse
Lakhal Raja	M.A	Ines Dahmen	En Thèse
Ali Mekki	M.A. Habilité (FS-Gafsa)	Raida Bradai Karray	En Thèse
Ines Feki	M.A. (ISB-Sfax)	Alif Chebbi	En Thèse
Héla Ghorbel	M.A. (ISB-Sfax)	Amina Maalej	En Thèse
Nozha Abid	M.A. (FS-Sfax)	Asma Mahmoudi	En Thèse
Sonia Ben Younes	M.A. (FS-Gafsa)	Emna Feki	En Thèse
Hanen Chakroun	M.A (ISB-Sidi Thabet)	Ahlem Jebali	En Thèse
Hédia Jemai	As. (FS-Gafsa)	Maha Affes	En Thèse
Firas Feki	Ingénieur général	Asma Saadallah	En Thèse
Fathi Aloui	Ingénieur en chef	Dorra Hentati	En Thèse
Med Ali Masmoudi	Ingénieur principal	Mariem Jeddi	En Thèse
Manel Hamza	Technologue	Mokhles Kouas	En Thèse
Jihen Ammar	Technologue (INSTM- Monastir)	Mouna Kehili	En Thèse
Najla Mhiri	Technicien principal	Sabrine Ben Ouada	En Thèse
Slim Louki	Technicien	Hana Zouch	En Thèse
Nidhal Baccar	Technicien	Meriam Cheffi	En Thèse
Sonia Kchaou	Préparateur	Raouia Boujelben	En Thèse
Selma Kchaou	Secrétaire		

INTITULE DES PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS

1. Projet 1: Traitement et valorisation des rejets: (Responsable: Prof. Sami Sayadi)

L'axe de traitement et de valorisation des rejets est un axe stratégique et rentre dans le cadre des priorités nationales. Au cours des dernières années, nos travaux se sont focalisés sur l'optimisation de la co-digestion des margines par l'incorporation d'autres sous-produits riches en carbone « substrats à fort potentiel méthane » telles que les graisses pour augmenter la productivité en méthane et les fientes de volailles pour assurer un meilleur équilibre du rapport C/N/P. Ensuite, dans le cadre d'une convention avec la Société de Service des Huileries (SSH) en collaboration avec l'Agence Nationale de gestion des Déchets (ANGED), le Laboratoire est parvenu à installer le procédé de digestion anaérobie des margines à une échelle de 100 m³. Cependant, nous sommes en attente du versement du budget complémentaire (70.000 DT) pour compléter le projet et achever l'étude technico-économique de la valorisation des margines par digestion anaérobie. Ce projet nous a permis de développer des relations contractuelles avec le ministère de l'environnement, l'ONAS, l'ANGED, l'ANPE pour résoudre des problématiques de grandes priorités en Tunisie à savoir la valorisation des margines, le traitement des lixiviats de

décharge par l'approche anaérobie-MBR, le traitement des eaux usées urbaines pour la réutilisation et en fin le traitement des effluents salins produits par les usines de conditionnement des produits de la mer. Ce projet est réalisé avec des co-finacements européens dans le cadre des projets FP7 du laboratoire.

Exemple: Traitement et valorisation des rejets avicoles de la société «Chahia» par biométhanisation:

Les rejets issus des sociétés d'abattage des volailles (graisses, sang, boues...) causent des sérieux problèmes pour l'environnement. La société avicole «Chahia» a confié au LBPE l'étude du traitement de ces rejets hydriques et le développement d'un procédé économiquement viable pour la valorisation de ses effluents. La biométhanisation de ces rejets peut être entreprise en vue de produire du biogaz. En effet, ces déchets sont riches en carbone et «à fort potentiel méthane» surtout pour les graisses, ce qui augmente la productivité en méthane. L'augmentation de la production d'énergie des digesteurs de traitement par méthanisation permet d'augmenter la rentabilité des unités et de réduire des émissions de gaz à effet de serre sur le plan national.

Notre travail consiste à l'étude, la conception et la mise en œuvre de nouveaux procédés de digestion anaérobie qui permettent de réduire le recours aux carburants fossiles en fournissant une source d'énergie renouvelable (biogaz).



Fig. 1: Photo du procédé de méthanisation des eaux usées de la société «Chahia».

Dans ce contexte, l'étude de la digestion anaérobie des effluents bruts de la société «Chahia» par un procédé biologique basé sur un réacteur continu à lit fixe (**Fig. 1**)a montré des meilleurs résultats en comparaison avec celles des effluents traitées par le procédé physicochimique utilisé dans la STEP de la société. En effet, des rendements épuratoires importants ont été obtenus témoignés par une production de biogaz de 2001/j à une charge volumique 1,27Kg DCO/m³.j (**Fig. 2**). En plus, les résultats relatifs à l'étude microbiologique des eaux usées de la société «Chahia» montrent que le traitement a permis l'élimination des germes pathogènes. La qualité physico-chimique et microbiologique des eaux usées de la société «Chahia» traitées par digestion anaérobie permet, par conséquent, leur déversement dans les canalisations publiques (ONAS).

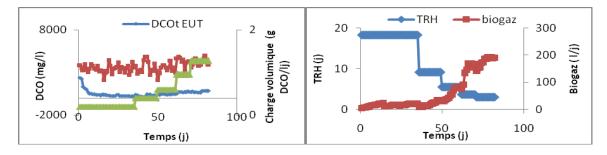


Fig. 2: Evolution de la DCO des eaux usées «Chahia» et du biogaz produit en fonction du TRH et de la charge volumique au cours de temps.

2. Projet 2: Bioremédiation: Biodégradation des hydrocarbures, production des biosurfactants et biodiversité microbienne: (Responsable: Prof. Mohamed Chamkha)

Exemple: Biodégradation des mercaptans issus de cheminées de l'usine de transformation du phosphate de Sfax:

L'industrie de transformation du phosphate génère des odeurs nauséabondes qui entraînent des nuisances aux ouvriers et fonctionnaires des usines, ainsi qu'aux habitants des alentours. Au sein de l'usine de Sfax, deux unités de lavage en continu des gaz, par des eaux de sondage, ont été installées pour réduire les odeurs dues aux polluants contenus dans les cheminées des deux unités d'acide phosphorique et de TSP (Triple Super Phosphate). Cependant, les odeurs désagréables continuent à s'échapper. Les principaux objectifs de notre travail consistent à: la caractérisation physico-chimique et microbiologique des eaux de lavage de ces gaz; la recherche et le développement d'inoculums microbiens capables de dégrader les mercaptans contenus dans ces eaux de lavage; et l'isolement et la caractérisation des bactéries aérobies, et l'étude de leurs capacités biodégradatives des mercaptans.

Un consortium bactérien CX55, constitué par une population microbienne dominée par des bacilles mobiles, et qui est capable de croître en présence des eaux de lavage des unités d'acide phosphorique et du TSP a été adapté à 55 °C. Une souches bactérienne CAT37 a été isolée après des enrichissements sur le 1-décanethiol, utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. D'après les caractéristiques phénotypiques et l'étude phylogénétique basée sur le gène codant pour l'ARNr 16S, CAT37 est affiliée au genre *Brevibacillus* avec l'espèce *Brevibacillus agri*, l'espèce la plus proche (Similarité de 97,5%) (**Fig. 3**). La souche CAT37 a pu dégrader en aérobiose, la totalité du 1-décanethiol et de son produit d'auto-oxydation le décyldisulfide, la totalité du 1-dodécanethiol et de son produit de l'auto-oxydation le dodécydisulfide, après 30 jours d'incubation à 37 °C. Ces taux de biodégradations des mercaptans sont promoteurs et pourraient servir pour performer les stratégies de biofiltration.

Un consortium bactérien capable d'utiliser les eaux de lavage a pu être également adapté à 37 °C. Il présente une efficacité de biodégradation de la matière organique présente. Ceci à été vérifié par la mesure de la DBO₅, TOC et par des analyses GC-MS. Une souche bactérienne SH6, a été isolée après des enrichissements sur le 1-dodecanethiol. Elle est affiliée au genre *Staphylococcus*, avec l'espèce *Staphylococcus capitis*, l'espèce la plus proche (Similarité de l'ARNr 16S de 99,7%). La souche SH6 montre des potentialités biodégradatives intéressantes sur le 1-dodécanethiol et elle n'exige pas la présence de l'extrait de levure (**Fig. 4**). Ceci a été vérifié par le suivi de la croissance bactérienne, par mesure de la DO à 600 nm et par dénombrement des colonies, après repiquage sur milieu solide. Cette souche est capable de croître en présence des concentrations de 1-dodécanethiol qui varient de 1 à 10 mM, avec une concentration optimale de 3 mM. Les analyses GC montre que SH6 est capable de dégrader complètement le 1-dodécanethiol au bout de 72 h d'incubation. La souche SH6 présente également une croissance sur le 1,8-octanedithiol et le 2,3-butanedithiol. Elle synthétise aussi un biosurfactant capable de réduire la tension de surface et de faciliter l'accession des cellules aux substrats hydrophobes.

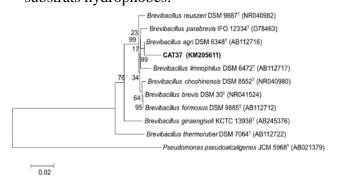


Fig. 3: Dendrogramme montrant l'affiliation de la souche CAT37 au sein du genre *Brevibacillus*.

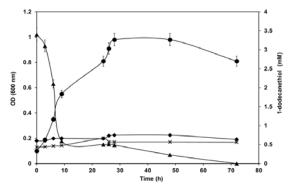


Fig. 4: Croissance de la souche SH6 sur 3 mM dodécanethiol à 37 °C(●) DO_(600 nm); (▲) Concentration du 1-dodécanethiol; (×) Témoin biologique; (◆) Témoin abiotique.

3. Projet 3 : Production de biomasse et de molécules d'intérêt ou élimination de polluants par culture des microalgues: (Responsable: Prof. Abdelhafidh Dhouib)

Les microalgues et les cyanobactéries sont capables de produire des huiles, glucides, protéines et d'autres substances d'intérêts. Elles contribuent à la séquestration du CO₂ et la dépollution de l'air et des eaux. Différents biotopes Tunisiens ont permis d'isolerdifférentes souches qui ont été étudiées en détail pour améliorer leur croissance, leur capacité d'accumulation des substances d'intérêts ou leur capacité de dépollution. Le compromis entre une croissance rapide et une grande capacité de production ou de dépollution est très difficile à réaliser, nous avons donc souvent recours à une première phase de culture en conditions optimales pour la biomasse suivie d'une étape de stress pour accumuler le maximum de substances recherchées.

Nos travaux ont été focalisés sur le traitement des eaux et la production de lipides riches en acides gras saturés ou polyinsaturés utilisables pour la production de biodiesel ou l'alimentation. Les résultats obtenus en 2015 se résument comme suit :

- *Amphorasubtropica*, cultivée sur milieu et conditions optimisés en continu avec D = 0,45 j⁻¹, donne une productivité en biomasse P_x =0,252 g L⁻¹ j⁻¹et une productivité en lipides P_L = 0,045 g L⁻¹ j⁻¹. Incubée sous carence en Si ou excès en P, sa teneur en lipides augmente de 251 à 451 et 423 g kg⁻¹, respectivement.
- *Tetraselmis marina*, cultivée sur milieu et conditions optimisés en continu avec $D = 0.45 \text{ j}^{-1}$, donne $P_x = 0.258 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ et $P_L = 0.026 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Incubée sous addition de glucose (1 g L⁻¹), sa teneur en lipides augmente de 253 à 545 g kg⁻¹.
- *Picochlorum sp.*, cultivée sur milieu et conditions optimisés en continu avec $D = 0.6 \text{ j}^{-1}$, donne $P_x = 0.427 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ et $P_L = 0.068 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Incubée sous carence en P ou excès en N, sa teneur en lipides augmente de 160 à 520 et 499 g kg⁻¹, respectivement.
- Dunaliella sp., cultivée sur milieu et conditions optimisés en continu avec $D = 0.7 \text{ j}^{-1}$, donne $P_x = 0.91 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ et $P_L = 0.164 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$. Incubée sous carence ou excès en P ou à basse température, sa teneur en lipides augmente de 292 à 645, 590 et 460 g kg⁻¹, respectivement.
- *Amphora* sp., lorsqu'elle est transférée de milieu et conditions optimisés à carence en P ou N, sa teneur en lipides augmente de 170 à 520 et 240 g kg⁻¹.
- *Navicula* sp., lorsqu'elle est transférée de milieu et conditions optimisés à carence en N ou Si, sa teneur en lipides augmente de 18 à 310 et 225 g kg⁻¹.
- Scenedesmus sp., cultivée sur eaux usées en continu avec $D = 0.6 \text{ j}^{-1}$, donne $P_x = 0.9 \text{ g L}^{-1} \text{ j}^{-1}$ avec une teneur en lipides de 4,9-13,2% et élimine 92-94%, 61-99% et 93-99% de DCO, NH_4 et P, respectivement.
- *Halamphora tunisiana* est riche en acides gras polyinsaturés (30%),dont plus 25% d'acide arachidonique et plus 22% d'acide eicosapentaénoïque.
- *Leptolyngbya* (cyanobactérie encore non identifiée). Sous stress produit EPS jusqu'à 4fois sa biomasse.
- *Gloecapsa gélatinosa*, sous stress thermique et lumineux dédouble sa teneur en acides gras saturés à longue chaine, qui atteint 82% du total lipidique ce qui donne à ces huiles une forte viscosité et stabilité oxydative.
- Une *Graesiella* (encore non identifiée) quadruple en mixotrophie, sa productivité spécifique en lipides avec 50% d'acides gras polyinsaturés de type ω-3 et ω-6.

Ces travaux ont fait l'objet de 6 publications, 1 thès esoutenue, 2 communications et 1 stage de 5 mois à l'Université d'Almeria, Espagne.

4. Projet 4: Etude de la digestion anaérobie pour le traitement et la valorisation énergétique des déchets organiques solides: (Responsables: Dr. Sonia Khoufi et Prof. Sami Sayadi)

Le traitement des ordures ménagères occupe une place importante dans les soucis environnementaux des pays développés et du pays en développement car ces déchets ont fortement évolué en quantité et en qualité depuis quelques décennies. Dans une vision de développement durable et d'analyse de cycle de vie, la méthanisation se confirme comme étant une solution souhaitable pour le traitement des matières organiques. Cependant, les diverses technologies de méthanisation ont des avantages et des inconvénients, mais il n'y a pas un procédé unique et idéal pour la mise en valeur des matières organiques. Dans ce sens, des études plus approfondies doivent être réalisées dans le but d'analyser les informations précises des technologies par rapport aux besoins et contraintes de la région ciblée. Dans ce contexte, le présent projet proposé pour le contrat programme 2014-2017 vise à améliorer et approfondir les connaissances acquises dans le domaine de la digestion anaérobie des déchets solides avec un objectif de traitement et de valorisation énergétique des déchets disponibles à l'échelle nationale.

Comme première activité dans ce projet, nous avons choisi d'étudier la digestion anaérobie de la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) qui est un déchet très hétérogène et variant dans le temps en qualité et quantité. Durant cette étude, une caractérisation par catégorie de déchets solides collectés à partir du site de transfert de Sidi Mansour, Sfax, a été réalisée. Les déchets ont été triés selon différentes catégories: putrescibles, plastiques, papiers, verres, métaux, textiles, DMS et autres. Une caractérisation physico-chimique de la FFOM a été aussi effectuée. Les résultats ont montré une composition très variable et assez complexe avec une teneur importante en matière organique par rapport à la fraction minérale, une concentration élevée en matière grasse, des faibles teneurs en sucres totaux et quelques traces de métaux lourds.

L'étude de la digestion anaérobie de la FFOM brute en batch et semi-continu a été réalisée dans un digesteur anaérobiede volume utile 11 L(**Fig. 5**). Le digesteur a été inoculé par un mélange de boues apportées de la STEP de Charguia. Cette biomasse a été acclimatée au substrat (FFOM) pendant 6 mois en appliquant de différents rapports MV substrat/ MV Inoculum variant de 0,5 à 2. Un suivi journalier de volume du biogaz produit ainsi que certains paramètres physico-chimiques (AGV, pH, MS, etc...) ont été effectués. Les résultats ont montré que l'augmentation du rapport S/I entraine une diminution du rendement en biogaz qui été de 0,8; 0,7; 0,6 et 0,57 L biogaz/ g MV_{intoduit} pour S/I égal à 0,5; 0,75; 1 et 2, respectivement. La détermination du pH, de l'alcalinité et des AGV a montré une stabilité du procédé anaérobie au cours du traitement de la FFOM.



Fig. 5: Réacteur anaérobie pour le traitement de la FFOM.

Dans une deuxième phase, l'étude de la digestion anaérobie de la FFOM en continu a été menée avec une charge volumique de 1,34 g MV/L/j. Au cours de cette phase, le volume du biogaz produit ainsi que certains paramètres physico-chimiques (AGV, pH, MS, TAC, etc...) ont été suivis. Les résultats ont montré une production maximale de biogaz de 15 L à partir de 30ème jour de fermentation avec un rendement moyen de 0,6 L biogaz/g MV_{intoduit}.

5. Projet 5 : Evaluation de risques environnementaux et valorisation de bio-ressources: (Responsables: Dr. Zouhaier Bouallegui et Prof. Sami Sayadi)

L'investigation des potentialités des résidus et des sous-produits des industries agroalimentaires est un créneau très porteur dans un pays comme la Tunisie surtout en vue d'une gestion durable de nos ressources. A titre indicatif nous citons les sous-produits de l'olivier. En effet, l'olivier, arbre typique du bassin méditerranéen, a été largement étudié. Il représente un réservoir immense de composés phénoliques qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de point de vue leurs structures chimiques, et possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Ces composés sont bio-disponibles principalement dans l'huile d'olive dont ils confèrent une multitude de bienfaits sur la santé humaine. Toutefois, la production d'huile d'olive, s'accompagne de la décharge d'une masse importante de rejets à la fois solide et liquide. Il s'agit des grignons, des margines et les produits de taille des oliviers. Ces résidus sont fortement chargés en matière phénolique polluante de moins en moins biodégradable. La valorisation de ces sous-produits est une solution qui vise une meilleure exploitation de cette richesse naturelle. Ainsi, l'extraction de molécules d'intérêt et le criblage de leurs activités biologiques seraient l'exemple illustrant une voie prometteuse de valorisation. Les exemples cidessous donnent l'illustration de quelques résultats obtenus au cours de l'année 2015:

- Prévention des effets toxicologique des contaminants alimentaires par des composés issus de l'olivier :

Cette partie a été consacrée à l'étude de l'effet protecteur des composés phénoliques extraits des feuilles de l'olivier, contre les perturbations induites par le bisphénol A comme contaminant alimentaire. Le bisphénol A (BPA) est un monomère des matières plastiques qui sont largement utilisés dans notre vie quotidienne. Le BPA peut avoir plusieurs conséquences sur les paramètres homéostatiques. Nos résultats montrent un effet protecteur des composés phénoliques extraits de feuilles d'olivier contre les désordres métaboliques induits dans le modèle animal (rat). En effet, la supplémentation de ces composés à des animaux traités par le bisphénol A permet le rétablissement des paramètres sérique, hépatique et rénaux chez des rats adultes ou jeunes (Fig. 6).

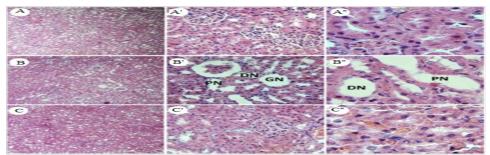


Fig. 6: Coupes histologiques des tissus rénaux de rats témoins (Série A), rats traités par BPA (Serie B) et rats traités par BPA associé à l'oleuropéine (Serie C).

- Caractérisation phytochimique des extraits de feuilles d'olivier:

L'objectif du travail mené dans cette partie était d'investiguer la possibilité d'utiliser les feuilles d'olivier comme source naturelle pour la préparation d'extraits riches en composés phénoliques ayant une activité antioxydante intéressante. Nos expériences ont porté sur la comparaison de différents échantillons de feuilles d'oliviers collectés de plusieurs régions de la Tunisie. Des extractions aqueuse et hydro-alcoolique ont été effectuées. La caractérisation phytochimique des différents extraits a montré une richesse en composés phénoliques (méthode au Folin-Ciocalteu). L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a montré que l'oleuropéine constitue la majeure partie des composés phénoliques et sa

concentration varie selon la variété et la région de collecte. Différentes autres analyses ont été réalisées pour évaluer les activités antioxydantes des extraits et qui ont permis de conclure qu'il serait très intéressant de développer des issus de valorisation plus poussés pour un sous-produit telles que les feuilles d'olivier.

Production scientifique de 2015

Publications parues en 2015 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture :

- 1) Bechambi, O., Chalbi, M., Najjar, W., Sayadi, S. (2015). Photocatalytic activity of ZnO doped with Ag on the degradation of endocrine disruptingunder UV irradiation and the investigation of its antibacterial activity. *Applied Surface Science*, 347: 414-420.
- 2) Bechambi, O., Sayadi, S., Najjar, W. (2015). Photocatalytic degradation of bisphenol A in the presence of C-doped ZnO: Effect of operational parameters and photodegradation mechanism. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 32: 201-210.
- 3) Bechambi, O., Touati, A., Sayadi, S., Najjar, W. (2015). Effect of cerium doping on the textural, structural and optical properties of zinc oxide: Role of cerium and hydrogenperoxide to enhance the photocatalytic degradation of endocrine disrupting compounds. *Materials Science in Semiconductor Processing*, 39: 807-816.
- 4) Ben Abdallah, M., Karray, F., Mhiri, N., Cayol, J.L., Tholozan, J.L., Alazard, D., Sayadi, S. (2015). Characterization of *Sporohalobactersalinus* sp. nov., an anaerobic, halophilic, fermentative bacterium isolated from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65 (2): 543-548.
- 5) Boukhris, M., Hadrich, F., Chtourou, H., Dhouib, A., Bouaziz, M., Sayadi, S. (2015). Chemical composition, biological activities and DNA damage protective effect of *Pelargonium graveolens* L'Hér. essential oils at different phenological stages. *Industrial Crops and Products*, 74: 600-606.
- 6) Bradai, M., Han, J., El Omri, A., Funamizu, N., Sayadi, S., Isoda, H. (2015). Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on human intestinal Caco-2 cell sat non cytotoxic concentrations. *Cytotechnology*, 1-9.
- 7) Chebbi, A., Jaoua, H., Loukil, S., Mhiri, N., Ammar, N., Sayadi, S., Chamkha, M. (2015). Biodegradation of malodorous mercaptans by a novel *Staphylococcus capitis* strain isolated from gas-washing wastewaters of the Tunisian Chemical Group. *International Journal of Environmental Science and Technology*, DOI 10.1007/s13762-015-0897-8.
- 8) Chebbi, A., Mhiri, N., Rezgui, F., Ammar, N., Maalej, A., Sayadi, S., Chamkha, M. (2015). Biodegradation of malodorous thiols by a *Brevibacillus sp.* strain isolated from a Tunisian phosphate factory. *FEMS Microbiology Letters* 362 (14), fnv097.
- 9) Chtourou, H., Dahmen, I., Jebali, A., Karray, F., Hassairi, I., Abdelkafi, S., Ayadi, H., Sayadi, S., Dhouib, A. (2015). Characterization of *Amphora* sp., a newly isolated diatom wild strain, potentially usable for biodiesel production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (7): 1381-1392.
- **10**) Dammak, I., Neves, M.A., Nabetani, H., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. (**2015**). Transport properties of oleuropein through nanofiltration membranes. *Food and Bioproducts Processing*, 94: 342-353.
- 11) Dammak, I., Neves, M., Souilem, S., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. (2015). <u>Material balance of olive components in virgin olive oil extraction processing</u>. *Food Science and Technology Research*, 21 (2): 193-205.
- 12) Feki, E., Khoufi, S., Loukil, S., Sayadi, S. (2015). Improvement of anaerobic digestion of waste-activated sludge by using H_2O_2 oxidation, electrolysis, electro-oxidation and thermo-alkaline pretreatments. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19): 14717-14726.
- 13) Feki, F., Weissenbacher, N., Assefa, E., Olto, E., Gebremariam, M.K., Dalecha, T., Shibru, B., Sayadi, S., Langergraber, G. (2015). Rain water harvesting as additional water supply for multi-storey buildings in ArbaMinch, Ethiopia. Desalination and Water Treatment 53 (4): 1060-1067.
- 14) Friha, I., Bradai, M., Johnson, D., Hilal, N., Loukil, S., Ben Amor, F., Feki, F., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S. (2015). Treatment of textile wastewater by submerged membrane bioreactor: In vitro bioassays for the assessment of stress response elicited by raw and reclaimed wastewater. *Journal of environmental management*, 160: 184-192.
- **15**) Friha, I., Feki, F., Bouallagui, Z., Sayadi, S. (**2015**). Cytotoxicity bioremoval achieved by a submerged membrane bioreactor operated at pilot scale for the treatment of surfactant wastewater. *Desalination and Water Treatment*, 53 (4): 1012-1017.
- **16)** Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F., Sayadi, S. (**2015**). <u>Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater</u>. *BioMed Research International*, 11p.doi.org/10.1155/2015/929424.
- 17) Ghorbel, H., FKII., Kalel, C., Jamoussi, K., Sayadi, S. (2015). <u>Benefic interactive effects between garlic consumption and serum iron excess</u>. *J Clin Toxicol*, 5: 224. doi:10.4172/2161-0495.1000224.

- **18**) Hamza, M., Sayadi, S. (**2015**). High production of *Aspergillus niger* β-glucosidase at pilot-scale and application for hydroxytyrosol release from olive by-product. *International Journal of Food Science & Technology*, 50 (8): 1882-1890.
- **19**) Hamza, M., Sayadi, S. (**2015**). <u>Valorisation of olive mill wastewater by enhancement of natural hydroxytyrosol recovery</u>. *International Journal of Food Science &Technology*, 50 (3): 826-833.
- **20**) Jebali, A., Acién, F.G., Gómez, C., Fernández-Sevilla, J.M., Mhiri, N., Karray, F., Dhouib, A., Molina-Grima, E., Sayadi, S. (**2015**). Selection of native Tunisian microalgae for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. *Bioresource Technology*, 198: 424-430.
- 21) Jemai, H., Sayadi, S. (2015). Heart histopathology and oxidative features in diabetic rats and protective effects of oleuropein. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6 (06): 383-389.
- **22**) Jemli, M., Karray, F., Feki, F., Loukil, S., Mhiri, N., Aloui, F., Sayadi, S. (**2015**). Biological treatment of fish processing wastewater: A case study from Sfax City (Southeastern Tunisia). *Journal of Environmental Sciences*, 30:102-112.
- **23**) Karray, R., Hamza, M., Sayadi, S. (**2015**). Evaluation of ultrasonic, acid, thermo-alkaline and enzymatic pretreatment on anaerobic digestion of Ulva rigida for biogas production. *Bioresource Technology*, 187: 205-213.
- **24**) Khoufi, S., Louhichi, A., Sayadi, S. (**2015**). Optimization of anaerobic co-digestion of olive mill wastewater and liquid poultry manure in batch condition and semi-continuous jet-loop reactor. *Bioresource Technology*, 182: 67-74.
- **25**) Mahmoudi, A., Ghorbel, H., Marrekchi, R., Isoda, H., Sayadi, S. (**2015**). Oleuropein and hydroxytyrosol protect from bisphenol A effects in livers and kidneys of lactating mother rats and their pups. *Experimental and Toxicologic Pathology*: 67 (7), 413-425.
- **26**) Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S. (**2015**). <u>Changes in microbial and soil organic matter following amendment with olive mill wastewaters</u>. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (12): 684-690.
- 27) Mekki, A., Feki, F., Kchaou, M., Sayadi, S. (2015). Grey wastewaters: Treatment and potential reuse in an arid climate. *Journal of Water Resource and Protection*, 7 (07): 471-481.
- **28**) Mekki, A., Fki, F., Kchaou, M., Sayadi, S. (**2015**). Short-term effects of grey wastewater on a mediterranean sandy soil. *Clean-Soil, Air, Water*, 43 (5): 754-760.
- **29**) Mnafgui, K., Derbali, A., Sayadi, S., Gharsallah, N., Elfeki, A., Allouche, N. (**2015**). Anti-obesity and cardioprotective effects of cinnamic acid in high fat diet-induced obese rats. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (7): 4369-4377.
- **30**) Pradel, N., Cayol, J.L., Fardeau, M.L., Karray, F., Sayadi, S., Alazard, D., Ollivier, B. (**2015**). <u>Analysis of a population of magnetotactic bacteria of the Gulf of Gabès, Tunisia</u>. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8.
- 31) Samet, I., Villareal, M.O., Motojima, H., Han, J., Sayadi, S., Isoda, H. (2015). Olive leaf components apigenin 7-glucoside and luteolin 7-glucoside direct human hematopoietic stem cell differentiation towards erythroid lineage. *Differentiation* 89 (5): 146-155.
- 32) Sekii, Y., Han, J., Isoda, H., Bouaziz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., Shigemori, H. (2015). Two isorhamnetin glycosides from Arthrochemum glaucum that inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Chemistry of Natural Compounds*, 51 (2): 338-340.
- 33) Smaoui, Y., Chaabouni, M., Sayadi, S., Bouzid, J. (2015). Coagulation-flocculation process for landfill leachate pretreatment and optimization with response surface methodology. *Desalination and Water Treatment*, 1-8.
- 34) Touati, A., Hammedi, T., Najjar, W., Sayadi, S., Ksibi, Z., (2015). <u>Photocatalytic degradation of textile wastewater in presence of hydrogenperoxide: Effect of cerium doping Titania</u>. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.
- 35) Zayen, A., Mnif, S., Jlaeïl, L., Bouaziz, M., Sayadi, S. (2015). <u>Phthalates accumulation inside an anaerobic membrane bioreactor for landfill leachate treatment</u>. *Desalination and Water Treatment*, 53 (4): 1136-1143.

Formation diplômante de 2015

- Liste des habilitations soutenues:
- 1) Ali Mekki: Traitement et réutilisation des biodéchets: impacts sur la biochimie du sol et écotoxicité. Habilitation Universitaire en Sciences Biologiques, FSS. Soutenue le 09/06/2015.
- Liste des thèses de doctorat es-sciences soutenues:
- 1) Amal Zayen Trabelsi: Essais de traitement des lixiviats par des procédés impliquant la digestion anaérobie: expérimentation, optimisation et modélisation. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 25/04/2015.
- 2) Ines Friha Belhadj: Les procédés biologiques à membranes immergées: mise en ouevre, optimisation et suivi biologique et moléculaire au cours du traitement des effluents industriels problématiques en Tunisie. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 30/04/2015.

- 3) Haifa Chtourou: Isolement, sélection et caractérisation de microalgues marines, optimisation des conditions de culture et d'enrichissement en lipides pour la production de biodiesel. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 23/01/2016.
- Liste des mastères spécialisés/professionnels soutenus:
- 1) Itidel Ben Abdallah: Contribution à la caractérisation du potentiel agronomique des boues de STEP et de digestat. Mastère professionnel: Higiène et sécurité alimentaire, FSS. Soutenu le 30/09/2015.
- 2) Hend Ayadi: Evaluation de la contamination marine par les hydrocarbures et identification des bioindicateurs de contamination, cas du littoral de Gabes. Mastère professionnel en Chimie organique, FSS. Soutenu le 19/10/2015.
- **3) Mariem Adhar:** La biodégradation de la progestérone. Mastère en Chimie organique, FSS. Soutenu le 13/11/2015.
- **4) Rihab Boubdallah:** Biodégradation des hydrocarbures et production des biosurfactants par une bactérie isolée de l'usine de transformation du phosphate de Sfax. Mastère professionnelenScienceset Technologie del'Environnement,ISBS.Soutenu le 14/12/2015.
- 5) Mariem Mtibâa: Etude du traitement d'un effluent riche en lubrifiants dans un bioréacteur BRM, isolement de souches microbiennes et étude du pouvoir de biodégradation. Mastère professionnel: Sciences et Technologies de l'Environnement, ISBS. Soutenu le 16/12/2015.

Conventions/contrats avec des partenaires socio-économiques nationaux

 Convention relative à la réalisation des analyses physico-chimiques et des métaux lourds sur des échantillons d'eau et de sédiments de la zone de Taparura: Société d'Etudes et d'Aménagement des Côtes Nord de la ville de Sfax, Décembre 2015.

Conventions dans le cadre des projets de coopération internationale

- PHC-Utique 2015 géré par le CMCU: 2015-2017; Code: 15G0808: Biodiversité et dynamique microbienne de certains environnements marins contaminés par des hydrocarbures dans des ports tunisiens; Biodégradation des hydrocarbures pétroliers et production des biosurfactants. En collaboration avec le Laboratoire INRA de Biotechnologie de l'Environnement de Narbonne Equipe Ecologie Microbienne et Biodiversité.
- **Projet CMCU:** 2015-2017; Code: 15G1133: Entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux et le Laboratoire INRA de Biotechnologie de l'Environnement de Narbonne: Optimisation et modélisation de la co-digestion anaérobie des déchets solides.
- **Projet bilatéral Tunisie-Afrique du Sud:** 2015-2017: Entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux et l'Université de Technology de Vaal: Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by advanced oxidation processes.
- **Projet IFS W/5412-1:** 2014-2016: Advanced oxidative pretreatment of municipal waste activated sludge for enhanced anaerobic digestion. Une somme de 12000 £ a été allouée par «International Foundation for Science».
- **Projet de coopération Tunisie/Wallonie-Bruxelles:** 2016-2018: Coopération entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux et l'Université Libre de Bruxelles: Amélioration de la digestion anaérobie des déchets solides: hydrolyse enzymatique.

LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes

(LBME)

مخبر البيوتكنولوجيا الجزيئية للكائنات معزولة النواة

Responsable : Pr. Ali GARGOURI

Email: faouzi.gargouri@cbs.rnrt.tn

LISTE DES MEMBRES DE L'EQUIPE 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
Yosra KAMMOUN	Docteur en Génie Biologie	FSS
Ines BEN HMAD	Docteur en Génie Biologie	FSS
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
Hanen MALLEK	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
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

OBJECTIFS GENERAUX

- ➤ Produire et Fournir des enzymes dégradatives et des molécules antimicrobiennes pour des applications industrielles diverses (IAA, textile, biocomposites, papeterie, etc..)
- ➤ Développer et Fournir des procédés BIO pour des applications en Biotechnologie
- Assister l'entreprise à valoriser ses déchets organiques en produits à forte valeur ajoutée intéressants plusieurs secteurs : Agroalimentaire, cosmétique et surtout en bioénergies (bioéthanol et biodiesel)...
- Fournir aux médecins et aux patients un service d'analyse moléculaire des gènes impliqués dans le cancer ainsi que d'autres tests moléculaires

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Production et études biochimiques et moléculaires des enzymes
- Isolement et études des potentialités biotechnologiques de levures et moisissures oléagineuses
- Exploitation de biomolécules de synthèse chimique ou biologique dans divers domaines d'application
- Expression hétérologue des protéines d'intérêt et leur utilisation comme cibles dans des expériences de phage display
- Etudes moléculaires (génétique et épigénétique) sur les gènes impliqués dans certains cancers et autres pathologies humaines.

LISTE DES PROJETS

Suite aux recommandations du CNEAR de réduire le nombre des projets à trois:

- **1-**Enzymes *dégradatives* fongiques et valorisation de la biomasse H. Belghith
- **2-**Potentialités fongiques en biotechnologie et bioénergies A. Gargouri
- **3**-Etudes et Expression hétérologue de gènes eucaryotes impliqués dans R. Gargouri le cancer et les maladies génétiques

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS:

Projet 1 : Purification d'enzymes et études biochimiques de pectinases de P. occitanis

Dans le cadre de nos activités sur les pectinases fongiques, nous avons entamé la purification d'une deuxième polygalacturonase du mutant CT1 de*Penicillium occitanis*, après une seule étape de purification sur colonne anionique Mono (FPLC). Ce résultat a été confirmé par le test d'activité ainsi par séquençage de l'extrémité N-terminale. Le résultat de séquençage génomique confirme que cette PGase est l'une des trois PGases déjà identifiées dans le génome. La caractérisation biochimique montre des différences notables entre les deux polygalacturonases déjà purifiées, en termes d'activité spécifique, de thermoactivité, exigence en ions, influence des effecteurs, etc... Notons que, la température optimale de la PG2 (35°C) est la moitié de la PG1 (70°C), cette température étant très bénéfique dans les industries agroalimentaires. Dans ce contexte, avec 5 U/ml de l'enzyme PG2 nous avons réussi l'amélioration de la clarification des jus de banane, poire et citron.

Une autre pectinase, la pectine lyase, a été exprimée dans le système bactérien. En optimisant des conditions de production de la pectinlysase fongique chez différentes souches BL21 d'E.coli, moyennant le vecteur d'expression pET21 utilisé pour l'expression intracellulaire. L'induction avec 0,4 mM d'IPTG pendant 16 h d'incubation à 30 °C chez la souche BL21 Origami dont le cytoplasme est maintenu à l'état oxydé, ce qui entraîne une amélioration du repliement de la protéine recombinante par formation de ponts disulfure, donnent le meilleur rendement d'activité pectin lyase. La pectin lyase recombinante purifiée a une masse moléculaire de 42 kDa.

Purification d'enzymes et études biochimiques d'endoglucanasehalophile de S. microspora

Pour une hydrolyse complète de la cellulose, plusieurs microorganismes (champignons et bactéries) synthétisent un groupe hétérogène d'enzymes cellulolytiques ayant une action synergique à savoir les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les β-glucosidases. Les cellulases sont le plus souvent des enzymes à caractère acidophile à l'exception de quelques cellulases bactériennes et plus rarement fongiques. Ces dernières sont des biocatalyseurs très demandés dans les applications industrielles telles que dans l'industrie textile, les endoglucanases agissant à pH neutre surmontent le problème de back-staining dans l'application de délavage de jeans (re-déposition de l'indigo sur le tissu en raison de l'utilisation des cellulases acides). Le présent travail entre dans le cadre de l'axe de recherche de production et de purification d'endoglucanases actives à pH neutre.

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. Dans un premier volet, nous avons entrepris d'établir les conditions de production et de révélation des activités cellulasiques, sécrétées par notre souche. Nous avons trouvé des résultats intéressants relatifs à l'effet du pH sur cette production. A titre d'exemple, nous avons révélé une activité endoglucanasealkaline sur milieu à base de glucose, uniquement à pH 8.

Dans un deuxième volet, nous avons amélioré la production des cellulases par fermentation en fedbach en utilisant un fermenteur de 20 litres, et un milieu contenant 1% de cellulose Avicel. La production d'enzymes était améliorée. Puis, nous avons appliqué le jus enzymatique de *Stachybotrysmicrospora* dans le domaine de la panification en comparaison de deux améliorants commerciaux. 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.

Par la suite, nous avons réussi la purification de deux endoglucanasesEG1 et 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 100% NaCl de la même colonne. EG1 et EG2 ont une température optimale à 50°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.

Un résultat inattendu et non moins intéressant a été obtenu : EG1 et EG2 sont halophiles : elles sont activées en présence de NaCl avec un optimum à 5M et 0.8M, respectivement. Une autre particularité d'EG1 c'est qu'elle résiste en présence des détergents ioniques et non ionique et surtout en présence de SDS 10% avec une activité résiduelle de 75% alors qu'EG2 est inactivée à 1% SDS. EG1 et EG2 sont stables en présence de 25% solvants organiques. Elles sont plus actives sur le β -glucane de l'orge que sur la carboxyméthyl-cellulose (CMC). L'étude des propriétés catalytiques de ces deux endoglucanases dans l'hydrolyse de deux substrats cellulosiques (la CMC et le β -glucane de l'orge) par une chromatographie sur couche mince et une HPLC montre qu'EG1 et EG2 sont différentes. Les deux endoglucanases purifiées ont un intérêt biotechnologique surtout dans le délavage de jeans et dans la composition des détergents commerciaux.

Intérêt de l'immobilisation d'une beta glucosidase de F. solani

L'utilisation industrielle de certaines enzymes exige certains critères tels que la stabilité thermique, la tolérance de solvants organiques. L'immobilisation est un procédé qui permet de satisfaire certaines exigences industrielles. Afin d'améliorer les compétences de la β -glucosidase purifiée à partir du champignon filamenteux *Fusariumsolani*, nous l'avons immobilisée. Différent supports et méthodes d'immobilisation montrent que le chitosane additionnée à 4% de glytéraldéhyde est la meilleure méthode d'immobilisation pour cette enzyme.Comparée à l'enzyme libre, l'enzyme immobilisée est plus stable en présence des conditions physicochimiques extrémes. En effet, on note une augmentation de 10°C de la température optimale de l'enzyme immobilisée, passant de 60 à 70°C. La thermostabilité de l'enzyme immobilisée a été aussi améliorée. A 60°C, la β -glu libre préserve uniquement 3.6% de son activité après une incubation de 30 min, et l'enzyme immobilisée garde 97% après cette même période, et elle garde 67% après 24h d'incubation dans cette température. A 70°C, nous avons noté une amélioration de la stabilité dans cette température ; notre β -glu libre est instable dans cette température, après immobilisation elle ne perd que 64 % de son activité initiale après une incubation 6h à 70°C.

Cette stabilité thermique est très intéressante sur le plan industriel parce que l'enzyme immobilisée pourrait être utilisée dans des procédés qui exigent les hautes températures pour réaliser des réactions rapides telles que la bioconversion de l'oleuropéine en hydroxytyrosol. La stabilité de l'enzyme libre et immobilisée dans un intervalle de pH allant de 2 à 9.5 a été étudiée après une incubation 16h à 4°C. Comparée à l'enzyme libre, l'activité de l'enzyme immobilisée a été améliorée dans les pH acides et basiques. L'effet est plus remarquable dans la zone des pH acides extrêmes où nous avons noté une nette amélioration de la stabilité; une augmentation de l'activité relative de 91% et 31% est notée au pH 3 et 2 respectivement.

L'immobilisation des enzymes permet de réutiliser l'enzyme dans de nombreux cycles de la réaction, ce qui diminue le cout du procédé. Notre β -glu immobilisée ne perd que 23% après 8 cycles. Ce résultat encourage l'utilisation dans des réacteurs en continue de cette enzyme. Différentes solvants organiques de nature polaire et apolaire ont été testés sur l'enzyme libre et immobilisée. Parmi les solvants utilisés l'enzyme immobilisée tolère mieux les solvants apolaires; l'hexane et le chloroforme. L'enzyme est activée en présence de ces solvants. L'activation atteint 437 % et 331% de son activité relative en présence de 20% d'hexane et de chloroforme respectivement. Par contre, l'enzyme libre garde 102% et 67 % de son activité relative en présence de 20% d'hexane et de chloroforme respectivement. L'ensemble de ces résultats encourage l'utilisation industrielle de notre β -glu immobilisée.

Production des β -glucosidases et xylanases par fermentation en milieu solide et la saccharification de la matière lignocellulosique

La stratégie de la fermentation solide et la nature de la source de carbone semble être d'une importance capitale aussi bien pour la production des β-glucosidases et xylanases que pour la croissance. Nous avons optimisé les paramètres de production des β-glucosidases et xylanasespar une souche de champignon thermophile soumise à des fermentations rentables comme la fermentation en milieu solide (SSF) avec des résidus agro-industriels comme source de carbone. Cette SSF a été réalisée dans le but d'avoir une productivité élevée et moins de contamination. Les extraits enzymatiques peuvent ensuite être directement employés. La pureté de ces enzymes n'est pas obligatoire pour diverses applications industrielles. Tout ceci encourage l'industrie à utiliser ce genre d'enzyme cellulolytique et hémicellulolytique, en raison d'un investissement minime et des faibles coûts d'exploitation. Les caractéristiques physicochimiques, cristallinité, la porosité du substrat, volume de substrat et la surface spécifique, pourraient être vitaux pour l'induction du système enzymatique dans les cultures fongiques. Ces paramètres peuvent en outre être utilisés comme référence dans des processus de production

commerciale dans des conditions de SSF. Par la suite nous avons réalisé un cocktail enzymatique comprenant ces enzymes produites et les cellulases de *Trichodermareesei*pour l'amélioration de la saccharification de la matière lignocellulosique (*Stipa tenacissima*) et la libération des sucres fermentescibles.

Utilisation des enzymes fongiques pour la production de biocomposites d'Alfa

Nous nous intéresserons dans cette étude aux fibres d'alfa (Sipatenacissima) qui constitue l'une des richesses végétales les plus abondantes à la Tunisie et qui de nos jours, restent peu exploitées. Avec cette étude, nous visons d'extraire des fibres unitaires longues à partir de la plante Alfa et d'analyser ses propriétés physicochimiques et mécaniques pour aborder des composites à base de ces fibres issues des différentes mécanismes d'extractions. L'intérêt de cette partie est d'étudier les différents mécanismes d'extractions des fibres de la biomasse végétales (ses avantages et ses inconvénients) afin d'optimiser un processus d'extraction des fibres unitaires longues tout en conservant ses propriétés mécaniques. La morphologie de l'Alfa a été étudiée en réalisant des coupes transversales et des coupes longitudinales de la feuille et en les observant par microscopie électronique à balayage et une microscopie optique de type Nikon ECLPSE LV150. Une extraction des fibres d'Alfa par voie chimique en utilisant l'eau oxygéné (H₂O₂) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) et une caractérisation des faisceaux des fibres obtenues mécaniquement par la machine DMA de la marque Bose (Electroforce 3200), alors ces fibres ont un comportement mécanique comparable à celle des autres fibres végétales connues comme le chanvre et le lin. Différents mécanismes d'extraction (mécanique, chimique, thermique et enzymatique) effectué afin d'obtenir des fibres unitaires longues de la plante Alfa. Différents essais pour bien optimiser les différents paramètres d'extraction (temps, température et dosage) et tout en conservant les propriétés de la fibre et des différentes observations microscopiques par le microscope optique de type Bresser DM400 Digitals pour examiner la surface de la fibre après chaque traitement. A la lumière des caractéristiques de ces fibres issues des différents procédés d'extraction, une corrélation établi entre la structure (densité, diamètre, longueur, taux de cellulose, angle microfibrillaire, taux d'adsorption d'humidité...) et les propriétés mécaniques des fibres cellulosiques obtenues. Un ensemble d'essai mécanique sur les fibres unitaires longues obtenues après les différentes extractions.

Biocomposite à base de bois

Les composites sont des matériaux qui ont permis le développement et le changement rapide des produits, des pratiques technologiques et industrielles. Parmi eux, les composites bois/plastiques (WPC : Wood Plastic Composite) sont composés de polymères thermoplastiques et de fibres de bois en plus ou moins grande proportion. De nos jours, les WPC sont utilisés dans plusieurs domaines tels que les mobiliers de jardin, le bâtiment (infrastructure et finition).

L'objectif de ce projet est la valorisation des sciures de bois issus des menuiseries de la société Tunisienne comme renforts dans une matrice polyéthylène. Le projet comprend trois parties : La première partie a été dédiée à la présentation de la sciure de Bois dans leur état brut et à l'étude de sa morphologie et de sa composition chimique. Les résultats de cette analyse ont révélé que le Bois (Pin d'Alep) contient 40% de cellulose, 25% d'Hémicellulose et 28% de Lignine avec 5% des extractives. Par ailleurs, l'analyse thermique de Bois montre une stabilité jusqu'à 180°C. Pour la seconde partie, le développement des traitements biologique (Enzymatique), physique (explosion à la vapeur), permettant d'extraire une fibre à forte teneur en cellulose avec le minimum d'attaque chimique. A titre d'exemple après le traitement par la Xylanase de *T. thermophilus*, la composition chimique devient 70.8% de cellulose, 13.2% d'hémicellulose et 9.7% de lignine. Les enzymes utilisés sont (Xylanase, Pectinase et Laccase) dont les deux premières sont élaborées dans notre laboratoire.

Nous avons caractérisé des matériaux composites à matrices PEHD élaborés par extrusion bi-vis et injection avec des taux de sciure de bois égale 18% massique. Afin d'étudier

l'influence des traitements enzymatique de sciure de bois sur les propriétés mécanique, morphologique, nous avons réalisés des essais thermique (ATG, DSC) et mécaniques les résultats révèlent une bonne concordance entre les propriétés physico-chimique et mécanique d'où l'influence de la composition chimique de la fibre sur le module d'Young, en fait nous remarquons que la rigidité augmente avec le taux de cellulose et lorsque le % de lignine diminue.

Projet 2: Les lipides fongiques: Production et application biotechnologique

Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés à l'étude de 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. Ces huiles microbiennes constituent une source importante de lipides et d'acides gras de haute valeur ajoutée pouvant être valorisée dans divers secteurs industriels.

Dans une première étape, un criblage qualitatif, grâce au Noir de Soudan et au Rouge de Nil, des champignons isolés à partir de différents biotopes 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 *Fusariumverticillioides*.

La seconde étape a été consacrée à l'étude des paramètres influençant la production de lipides à savoir la source et la quantité d'azote, la source carbone, le rapport C/N, ainsi que la température et le pH de la culture. L'effet de certains déchets issus des industries (pâte de neutralisation de l'huile de grignon d'olive et de l'huile de soja, huile de friture et le son de blé), sur la production de lipides par la souche E4-2, a été également étudié. La culture réalisée en présence del'huile de friture donne le meilleur rendement de production de lipides (1.67 g/l).

Par la suite, nous avons étudié l'influence de la méthode d'extraction des lipides. Les plus grandes quantités de lipides extraites à partir du mycélium sont obtenues en utilisant le mélange de solvants Chloroforme-Méthanol avec les proportions volumiques 2:1. Dans le but d'améliorer la qualité des extraits lipidiques à partir de *F. verticilloides*, une méthode d'extraction par fluide supercritique a été testée. Les résultats montrent que le rendement de la méthode par CO₂ supercritique est très faible par rapport à l'extraction par les solvants organiques (9 et 32 respectivement). Les extraits lipidiques obtenus par cette méthode ont été analysés par spectre d'absorption et les résultats montrent que toutes les fractions absorbent presque à une même longueur d'onde d'environ 480 nm. Ces fractions ont été testées sur des cellules cancéreuses HT29. L'analyse des résultats montre qu'on obtient une mortalité de 50% des cellules à une concentration d'environ 430 μg/ml.

Production de molécules lipidiques à usages chimiques et énergétiques par culture de levures oléagineuses

Une souche de levure, *Candida viswanathii*Y-E4, a fait l'objet d'une optimisation des conditions de production de lipides mettant en jeu plusieurs paramètres tels que (pH, Température, source d'azote, source de carbone, rapport C/N). Suite à des cultures menées dans un fermenteur de 7 litres nous avons étudié l'effet du mode batch et Fed-batch sur la production des lipides microbiens par la souche Y-E4. En utilisant le mode Fed-batch, la souche Y-E4 produit une matière sèche de l'ordre de 21.34 g/L contenant 10.5 g/L de lipide correspondant à un taux d'accumulation de 50% au bout de 192 h de culture. Le mode de culture Fed-batch permet une production deux fois plus important que celui en batch. D'autre part, nous avons utilisé des déchets issus des industries oléicoles comme source de carbone pour la culture la souche Y-E4 afin de produire des lipides par un bioprocédé économiquement rentable. L'analyse des lipides produits par la souche Y-E4 sur les différents déchets a montré que la composition acidique des huiles dépend de la composition initiale du déchet utilisé. Tous les substrats utilisés ont produit des lipides riches en acide oléique (C18:1) sauf celui issu de la culture de Y-E4 sur l'eau de lavage de la pâte de soja est riche en acide linoléique (C18:2, 53.7%). Les résultats trouvés montrent que ces substrats bon marché sont compétitifs des sources de carbones ordinaire utilisés

pour la production des lipides microbiens. Afin d'enrichir notre collection de souches de levure oléagineuse, nous avons isolé de nouvelles souches de levure à partir de différent biotope comme les fromages, les produits de charcuterie, margine, fleurs, sol, etc. Le criblage de 205 souches de levures nous a permis d'isoler 12 nouvelles souches de levures oléagineuses. L'identification moléculaire des souches oléagineuses (ayant une teneur en lipide plus que 20% de leurs matières sèches) a montré qu'il s'agit des levures appartenant aux genres *Rhodotorula*, *Cyberlindera*, *Yarrowia*, *Candida*, *Tricosporon* et *Rhodosporidium*.

La biomasse lignocellulosique représente une des ressources renouvelables la plus abondante sur terre, et certainement une des moins coûteuse. Sa conversion en lipides à usage carburant par des microorganismes oléagineux devrait permettre de subvenir à une partie des besoins énergétiques, couverts jusqu'à présent essentiellement par les produits dérivés du pétrole. Le procédé de production de lipides par les levures oléagineuses consiste à récupérer par hydrolyse le maximum de sucres issus à la fois des fractions cellulosiques et hémicellulosiques, suivi de la fermentation de ces sucres en lipides dans des conditions de culture très spécifiques. C'est dans ce contexte que nous avons évalué le potentiel oléagineux de certaines souches de levures locales. Les souches de levure Y-MG1, Y-E4, YD-1 et CTM-30125 sont des levures oléagineuses récemment isolées dans notre laboratoire et sont étudiées de point de vue croissance et production de lipide. Nous avons aussi étudié leurs profiles lipidiques de manière quantitative par analyse en GC et qualitativement par CCM ce qui a montré une richesse des lipides en acide gras mono-insaturé et la présence majoritaire de lipides neutres (TAG), respectivement. Par la suite, quatre types de déchets ont fait l'objet d'une hydrolyse acide afin de produire des sucres fermentescibles (son de blé, coque d'orge, paille de sorgho et coque de soja). Une caractérisation biochimique de ces déchets a été réalisée avant d'optimiser les conditions d'hydrolyse acide. Le son de blé et la coque d'orge sont choisis pour la saccharification acide et enzymatique en raison de leurs taux de sucres libérés (41.4 g/L pour le son de blé et 38.85 g/L pour la coque d'orge). Les hydrolysats acides ont été caractérisés par HPLC afin de quantifier les sucres et les sousproduits formés. Une étape de détoxification c'est avérée nécessaire afin d'augmenter le taux des biomasses et des lipides produits par nos levures oléagineuses. En deuxième lieu, on s'est intéressé à la production d'enzymes cellulasiques et hémicellulasiques par les deux champignons filamenteux Trichodermareesei Rut-C30 et Aspergillus niger F38. La combinaison de l'hydrolyse acide et enzymatique est une alternative encourageante afin de mieux exploiter la matière lignocellulosique et réduire le coût de production des lipides à usage énergétique.

La synthèse des molécules à haute valeur ajoutée (les sucro-esters) par la lipase de *Talaromycesthermophilus*

Les sucro-esters (SE) ou esters glucidiques d'acide gras peuvent être synthétisés soit par voie chimique ou voie enzymatique (par les lipases). Divers types de sucre peuvent être utilisés comme des accepteurs d'acyle dans la synthèse enzymatique des sucres esters tels que les monosaccharides, disaccharides, tri saccharides, sucres alcoolisés (xylitol, mannitol...). Un grand nombre de donneur d'acyle (acide gras saturée, l'acide gras insaturé et leurs dérivés) sont utilisés dans la synthèse de sucro-esters. Le nombre d'acylation dépend de la régio-sélectivité de l'enzyme, la température de la réaction et le type de solvant utilisé (polaire ou apolaire).

Ces esters sont des tensioactifs non-ioniques ayant des effets émulsifiants et stabilisants. En outre, ils ont des propriétés anti- microbienne, insecticide et anti-tumorale. C'est dans ce cadre de vision que nous avons développé ce thème de recherche pour l'exploitation des potentialités fongiques de *Talaromycesthermophilus*. Ainsi, le pouvoir de synthèse de ses deux formes de lipases (TTL I glycosylée et TTLII non glycosylée) a été exploité dans des réactions d'estérifications de différents sucres par une variété d'acides gras ayant différentes longueurs de chaînes (variant entre C4 et C18). Un rendement de synthèse des sucres esters de plus de 80% a été achevé, après 48 h, par la TTLI en utilisant l'hexane comme solvant et un rapport stœchiométrique de 1 entre le sucre et l'acide gras. L'analyse par LC/MS montre que la majorité des sucro-esters synthétisés sont des tri-esters. L'utilisation d'un solvant binaire 50/50(V/V)

(butanol/n-hexane) dans le milieu réactionnel a favorisé la formation des mono-esters. Ces scuro-esters ont été quantifiés par HPLC suite à leurs purifications par CCM préparative. Le spectre d'action des activités antimicrobiennes des différents sucro-esters synthétisés a été déterminé et testé contre une collection de souches fongiques et bactériennes. Les esters de l'acidecapryliqueont montréun fort effet antifongique surPenicilliumoccitanis, Fusariumsolani et $Aspergillus\ niger$ avecune CMIde5 μg / ml. L'activité antimicrobiennede ce dérivéa été prouvée, aussi, contre les bactéries GramPositif etGram négatives. Cependant, les estersLaurique n'étaient actifs que contre les bactéries Grampositives(exp. Bacilluslichemifornis) sans aucun effetcontre les champignons etles bactéries Gramnégatif.

L'effet «leuvuricide» des sucro-esters synthétisés à partir d'un mélange d'acide gras de coco (des acides gras à différentes longueurs de chaines variant entre C8 et C18) et de xylitol, a été étudié contre *C.albicans*, *S. cerevisiae* et *P. pastoris*. La caractérisation des propriétés de ces tensio-actifs (CMC, HLB, Tension de surface, propriétés émulsifiantes et moussantes) est en cours. Nous visions, ainsi, l'incorporation de ces sucro-esters dans un détergent-désinfectant biologique pour sols et surfaces destiné aux industries agro-alimentaires, et ceci dans le cadre d'une allocation de mobilité (MOBIDOC doctorant) avec la Société NEODEME.

Le mutant surporducteur de protéase et de chitinase du champignon Beauveriabassiana comme biopesticide efficace

Le pouvoir entomopathogène de deux souches de laboratoire *Beauveriabassiana* (P1 et P2) a été testé sur la mineuse de tomate *Tutaabsoluta*, dans le but de les exploiter comme bioinsecticide contre ce ravageur qui menace l'avenir de la production de tomate en Tunisie et dans le monde. Les résultats ont montré que les deux souches sont pathogènes ; P2, qui est hyperproductrice d'enzymes connues comme facteur de virulence, notamment une chitinase et des isoformes de protéase, est particulièrement plus efficace. En effet une suspension de 5.10⁷ spore/ml de cette souche peut causer une mortalité larvaire de 100 % après 5 j de traitement.

Recherche de molécules inhibitrices de la tyrosinase et de la mélanogenèse

La tyrosinase est l'enzyme clé de la mélanogenèse. Dans ce travail nous avons entamé la recherche d'inhibiteurs de cette enzyme en vue de les utiliser comme moyens de prévention de la pigmentation que ce soit dans le domaine cosmétique ou dans le domaine agroalimentaire (brunissement des aliments). Pour cette étude nous avons commencé par un criblage des inhibiteurs de la tyrosinase à partir de deux groupes des molécules chimiques nouvellement synthétisés, un groupe de dérivés des composés ferrocenyl-aryl-butene et un groupe de dérivés des composés Morita-Baylis-Hillmanadducts.

Concernant le groupe des molécules ferrocenyl-aryl-butene, nous avons trouvés 4 molécules inhibitrices de l'activité tyrosinase. La molécule ayant l'effet inhibiteur le plus puissant a une valeur d'IC50 de 0.02 mM. Les résultats de la cinétique de l'effet inhibiteur de la tyrosinase montrent qu'on a obtenu 3 molécules inhibitrices de type compétitif et une autre non compétitif. Pour le groupe des dérivés des composés Morita-Baylis-Hillmancyclicadducts nous avons trouvé 3 molécules inhibitrices de l'activité tyrosinase. L'analyse de la cinétique de l'inhibition enzymatique montre que la molécule 1a et 5f sont deux inhibiteurs compétitifs et le composé 3b est non compétitif. Parmi ces molécules inhibitrices, nous avons trouvé que la molécule 1a est l'inhibiteur le plus puissant et sa valeur de Ki est de 4.7 mM.

Après avoir trouvé des inhibiteurs de la tyrosinase, nous avons passé à la recherche des inhibiteurs de la mélanogenèse des cellules cancéreuses de mélanome de murine B16F10 parmi les inhibiteurs trouvés. Le résultat de cette étude montre qu'en présence de la molécule 1a, 3b et 5f, la quantité de la mélanine cellulaire a une diminution importante à une concentration de 50µM, sachant que nous avons montré que les concentrations testées sur cette lignée cellulaire sont non cytotoxiques.

Projet 3: Etude de l'expression des miR-10a et miR-10b dans le cancer colorectal

Les microARN (miRNA) sont des ARN endogènes, non codants de petite taille. Ces ARN ont été identifiés comme régulateurs post-transcriptionnel de l'expression génique. Des études antérieures ont montré que les miRNA exercent leurs fonctions à travers des appariements de bases imparfaits avec la région 3'UTR des ARNm cibles. Les miARN ont été aussi largement étudiés dans la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, le développement et l'apoptose.Par conséquent, la modification du profil d'expression de miRNA pourrait contribuer à la pathogenèse d'une grande variété de maladies humaines, y compris les néoplasies. Les miRNA peuvent agir comme des oncogènes en refoulant l'expression de gènes suppresseurs de tumeur cible ou en tant que suppresseurs de tumeurs en réprimant l'expression des oncogènes cibles.MiR-10a et miR-10b jouent un rôle important dans la genèse et le développement d'une variété de cancers humains. Ils ont été définis comme des miRNAs oncogéniques dans plusieurs cancers comme le NPC et le cancer gastrique. Cependant, la fonction de miR-10a et miR-10b et les mécanismes sous-jacents dans la carcinogenèse colorectale restent à élucider.

Dans cette étude, nous avons étudié l'expression de miR-10a et miR-10b chez 50 patients atteints de cancer colorectal, ainsi que dans 10 tissus témoins. Les résultats préliminaires montrent une baisse de l'expression de miR-10b dans les tumeurs par rapport aux témoins.Les modifications épigénétiques comme l'hyperméthylation de l'ADN sont étroitement associés avec l'inactivation génique. Des études récentes ont rapporté certains miRNAs dont l'expression est réprimée par méthylation dans quelques cancers humains. Afin d'élucider la cause de la baisse de l'expression de ces miRNA dans le cancer colorectal, nous avons étudié le statut de méthylation des régions génomiques en amont de miR-10a et miR-10b. Nous avons analysé par MSP, l'ADN de 50 patients et nous avons constaté que l'hyperméthylation des ilots CpG dans le promoteur serait un des moyens de régulation de l'expression des miR-10a et -10b dans les tissus tumoraux. CCR, nous nous sommes intéressés corégulateurtranscriptionnel RIP140 en analysant la protéine par IHC et l'ARNm par QRT-PCR et la méthylation des îlots CpG au niveau de la région promotrice.

Etude fonctionnelle du gène TTC40 dans le cancer du nasopharynx :

Rappelons brièvement que nous avons identifié par MSAP-PCR, une méthylation aberrante de la région 5' du gène *tetra-trico-peptide-repeat-domain 40* (TTC40) dans les tumeurs NPC. Ce gène code pour une protéine encore hypothétique bien que le transcrit ait été récemment caractérisé et publié. Le gène TTC40 code pour une protéine hypothétique de 2715 aa qui referme 13 répétitions du motif TPR (répétition tetra-trico-peptide) identifié chez la levure comme un module d'interaction protéine-protéine intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. Au cours de ce contrat, les études fonctionnelles sont privilégiées pour élucider la fonction de TTC40 et son implication dans le NPC. C'est dans le cadre d'un projet CNRS - DGRS entre notre équipe et celle du Pr Busson (IGR France) que nous avons proposé d'identifier la fonction de TTC40 en utilisant les lignées cellulaires malignes de NPC dérivées de tumeurs xénogreffées X666 et C17.

Ce travail a été entamé par l'étude *in vitro* de l'effet de la méthylation aberrante sur la régulation transcriptionnelle du gène TTC40. L'agent déméthylant 5-aza-2'-déoxycitidine, analogue de la cytidine, était choisi pour le traitement des cellules tumorales de NPC C666.1 ayant une méthylation aberrante de la région 5' du gène TTC40. L'analyse par RT-PCR et QRT-PCR a montré la ré-expression de TTC40 dans les différentes conditions testées : 1µM, 5µM, 10 µM et 50 µM de 5-aza-2'-déoxycitidine. De même, nous avons noté que l'expression de TTC40 est nettement plus importante dans les cellules traitées à la fois par l'agent déméthylant « 5-aza-2'-déoxycitidine » et un inhibiteur des histones déacethylases(iHDAC) « le panobinostat » (10 µM et 100 nM, respectivement), (facteur de 250 X). Toutefois, le traitement par l'iHDAC seul n'a montré aucun changement sur le profil d'expression de ce gène. Ce résultat, nous a permis de conclure que la méthylation des CpG semblerait la principale modalité de régulation

transcriptionnelle du gène TTC40 qui nécessiterait l'interaction avec d'autres protéines très importantes dans la régulation épigénétique, notamment les histones déacethylases.

Après avoir vérifié l'effet de la méthylation sur la répression du gène TTC40, nous avons entamé la 2^{ème} partie de ce travail qui consiste à caractériser le(s) isoforme(s) généré(s) par ce gène dans les cellules NPC. Rappelons que le transcrit complet en ARNm est prédit à 8293 nucléotides (NM 001200049), d'après l'analyse des données RNAseq et la reconstruction de transcrits correspondants(projet Illumina). Par ailleurs, d'autres transcrits de tailles moins importantes ont été publiés auparavant et recouvrant essentiellement la région 5' du transcrit TTC40. Afin d'identifier le ou les transcrits de TTC40 exprimés par les cellules C666.1 traitées à la fois par l'agent déméthylant et l'iHDAC, nous avons procédé à une réaction d'enrichissement des ARNm moyennant une sonde biotinylée et de billes magnétiques coatées par la streptavidine. Il s'agit d'une sonde de taille 25 bases, spécifique à tous les transcrits TTC40 identifiés auparavant et également prédits par la base de données UniProtKB/Swiss-Prot. Après l'enrichissement des ARNm spécifiques, des réactions successives de réverse transcription, poly-adénylation et d'amplification génique ont été réalisées afin d'identifier le(s) isoforme(s) généré(s) par le gène TTC40. Le résultat de ce travail a montré la présence d'un seul transcrit dans les cellules C666.1 de taille plus de 8 Kb qui correspondrait au transcrit prédit de 8,293 Kb (NM 001200049). Dans la suite, nous envisagerons de se focaliser sur ce transcrit pour étudier les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de TTC40 dans le contexte cellulaire nasopharyngé.

Recherche de biomolécules douées de capacité anti-thrombotiques

Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde. Ces pathologies nécessitent des traitements à base de molécules à effets anti thrombotiques. En thérapie, malgré qu'il y a une multitude de choix de molécules à prescrire pour traiter ou prévenir ces maladies vasculaires, on note plusieurs inconvénients accompagnant ces médicaments ; il serait donc intéressant d'identifier de nouvelles molécules.

L'objectif de cette étude est de tester l'effet anticoagulant et antiagrégant d'une série de molécules à occurrence naturelle et synthétisées chimiquement. L'activité anticoagulante a été évaluée *in vitro* en utilisant trois tests à savoir le temps de Quick (TQ), le temps de céphaline activé (TCA) et le temps de thrombine (TT). Ces trois tests sont réalisés avec un pool de plasma contenant le plasma pauvre en plaquettes (PPP) de plusieurs individus sains. Les résultats montrent qu'aucune molécule testée n'est douée de pouvoir anticoagulant. L'effet antiagrégant des molécules a été évalué *in vitro* par les tests d'agrégation plaquettaires (la méthode de turbidimétrie). Nous avons trouvé parmi les molécules testées, quatre ayant un effet antiagrégant dont trois inhibent l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique alors que la quatrième inhibe plutôt l'agrégation induite par l'ADP.

Comme perspectives, nous envisageons de d'étudier la cytotoxicité de ces molécules, d'explorer *in vivo*, chez un modèle animal, les activités anti-agrégantes observées *in vitro*.

Continuation de l'étude des molécules antagonistes de l'apoptose médiée par la surexpression de p53 chez la levure

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 *S. 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 (reactiveoxygenspecies). 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 *Cydoniavulgaris*, et des graines d'une plante herbacées appartenant à la famille des renonculacées *Nigellasativa* 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. Les deux extraits ont été fractionnés et la fraction active du Coing est actuellement soumise à des analyses chimiques par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour l'identification de sa nature.

Nous avons aussi purifié la molécule de l'extrait des nigelles et nous avons déterminé son effet sur les fonctions mitochondriales et les ROS générés lors de l'apoptose. 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 les 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-. 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.

Expression du VEGF et recherche de peptides antagonistes par phage display :

La croissance d'une tumeur solide est limitée par sa vascularisation. Si elle n'était pas envahie 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 permis 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 néovascularisation 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. Les deux formes majeures du VEGF (165 et 122) ont été isolées, clonées et séquencées.

La production de la protéine recombinante a été effectuée dans le système d'expression *Ecoli*BL21(DE3) en utilisant le vecteur pET21a. Plusieurs optimisations ont été réalisées afin de purifier la protéine recombinante sur colonne HisTrap. 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 alors menées pour la sélection de peptides interagissant avec la protéine pro-angiogénique VEGF165. Trois banques de peptides sur phage (Ph.D C7C, Ph.D.7 et Ph.D.12) ont été utilisées pour la sélection de peptides interagissant avec la protéine recombinante produite. La souche bactérienne utilisée pour la propagation du phage est la 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 ~50 µg de la protéine recombinante VEGF 165. L'ADN simple brin de 100 clones a été vérifié sur gel d'agarose 0.7%. Les clones isolés ont donné un signal significativement plus élevé que celui du bactériophage seul. Les signaux étaient détectables pour une concentration de phages = 10^{11} pfu/ml suggérant que les peptides sélectionnés peuvent se lier spécifiquement avec forte affinité. L'étape suivante sera l'évaluation

de l'activité biologique de la protéine pro-angiogènique produite et des peptides antagonistes sélectionnés

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. doi: 10.1007/s12010-014-1243-1. Epub 2014 Sep 20.*
- 2) Allaya N1, 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 May;36(5):3807-14. doi: 10.1007/s13277-014-3022-6. Epub 2015 Jan 20.
- 3) Abdelmaksoud-Damak R1, Miladi-Abdennadher I1, Triki M1, Khabir A2, Charfi S2, Ayadi L2, Frikha M3, Sellami-Boudawara T2, Mokdad-Gargouri R4. Expression and mutation pattern of β-catenin and adenomatous polyposis coli in colorectal cancer patients. Arch Med Res. 2015 Jan;46(1):54-62. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.01.001. Epub 2015 Feb 3.
- **4) Benhmad I1, Boudabbous M1, Yaîch A1, Rebai M1. Gargouri A2.**A novel neutral, halophile Stachybotrys microspora-based endoglucanase active impact on β-glucan. Bioprocess Biosyst Eng. **2016** *Feb 10. [Epub ahead of print]*
- 5) Sabrine Hanana, Ahmed Elloumi, Vincent Placet, Hajer Tounsi, Hafedh Belghith, Chedly Bradai. 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. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.018.* Available online 22 March 2015.
- 6) Damak N1, Abdeljalil S, Taeib NH, Gargouri A. Cloning and Genomic Organization of a Rhamnogalacturonase Gene from Locally Isolated Strain of Aspergillus niger. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015 Aug;176(8):2314-27. doi: 10.1007/s12010-015-1720-1. Epub 2015 Jul 5.
- 7) Hadiji-Abbes N1, Mihoubi W1, Martin M2, Karakasyan-Dia C3, Frikha F4, Gergely C2, Jouenne T3, Gargouri A1, Mokdad-Gargouri R5. Characterization of C69R variant HBsAg: effect on binding to anti-HBs and the structure of virus-like particles. *Arch Virol.* 2015 Oct;160(10):2427-33. doi: 10.1007/s00705-015-2515-y. Epub 2015 Jul 15.
- 8) Kamoun Y1, Mabrouk I2, Delahodde A3, Boukid F4, Yacoubi-Hadj Amor I4, Mokdad-Gargouri R1, Gargouri A5. Overexpression of yeast thioredoxin TRX2 reduces p53-mediated cell death in yeast. Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Oct;99(20):8619-28. doi: 10.1007/s00253-015-6886-5. Epub 2015 Aug 12.
- 9) Abdelmaksoud-Dammak R1, Saadallah-Kallel A, Miladi-Abdennadher I, Ayedi L, Khabir A, Sallemi-Boudawara T, Frikha M, Daoud J, Mokdad-Gargouri R. CpG methylation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) and P53 mutation pattern in sporadic colorectal cancer. Tumour Biol. 2015 Aug 28. [Epub ahead of print].
- 10) Hadiji-Abbes N1, Trifa F1, Choura M1, Khabir A2, Sellami-Boudawara T2, Frikha M2, Daoud J2, Mokdad-Gargouri R3. A novel BRCA2 in frame deletion in a Tunisian woman with early onset sporadic breast cancer. *Pathol Biol (Paris)*. 2015 Sep;63(4-5):185-9. doi: 10.1016/j.patbio.2015.07.009. Epub 2015 Aug 29.
- 11) Ali Gargouri, Catherine Macadré and Jaga Lazowska. A single mutation in the 15S rRNA gene confers non sense suppressor activity and interacts with mRF1 the release factor in yeast *mitochondria*. *Microbial Cell, Vol. 2, No. 9, pp. 343 352; DOI: 10.15698/mic2015.09.223*
- 12) Boudjema Saoudi, Amina Habbeche, Bilal Kerouaz, Soumaya Haberra, Zamen Ben Romdhane, Lazhari Tichati, Mokhtar Boudelaa, Hafedh Belghith, Ali Gargouri, Ali Ladjama. Purification and characterization of a new thermoalkaliphilic pectate lyase from Actinomadura keratinilytica Cpt20. Process Biochemistry, Volume 50, Issue 12, December 2015, Pages 2259-2266. doi:10.1016/j.procbio.2015.10.006. Available online 14 October 2015.
- 13) Feki K1, Kamoun Y2, Ben Mahmoud R1, Farhat-Khemakhem A3, Gargouri A2, Brini F4. Multiple abiotic stress tolerance of the transformants yeast cells and the transgenic Arabidopsis plants expressing a novel durum wheat catalase. *Plant Physiol Biochem.* 2015 Dec;97:420-31. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.10.034. Epub 2015 Oct 31.
- 14) Samia Azabou, Yousra Abid, Haifa Sebii, Imene Felfoul, Ali Gargouri, Hamadi Attia. Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by Fusarium solani pisi for enzymatic extraction of lycopene. LWT Food Science and Technology, Volume 68, May 2016, Pages 280-287. doi:10.1016/j.plaphy.2015.10.034. Epub 2015 Oct 31
- 15) Dabbeche-Bouricha E1,2,3, Hadiji-Abbes N1, Abdelmaksoud-Damak R1, Alaya N1, Ayadi W1, Charfi S4, Khabir A4, Sellami-Boudawara T4, Mokdad-Gargouri R5. Quantitative measurement of iNOS expression in melanoma, nasopharyngeal, colorectal, and breast tumors of Tunisian patients: comparative study and clinical significance. *Tumour Biol. 2015 Nov 7. [Epub ahead of print]*

- 16) Hanen Mallek-Fakhfakh, Hafedh Belghith. Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β-glucosidase from Talaromyces thermophilus and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides *Carbohydrate Research, Volume 419, January 2016, Pages 41-50 doi:10.1016/j.carres.2015.10.014 Available online 14 November 2015*
- 17) HadjKacem B1, Mkaouar H2, Ben Amor I3, Gargouri J3, Gargouri A2. Purification of glycocalicin from human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016 Jan 1;1008:11-4. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.09.044. Available online 21 December 2015*
- 18) Hajer Tounsi, Azza Hadj Sassi, Zamen Ben Romdhane, Marwa Lajnef, Jean-William Dupuy, Delphine Lapaillerie, Anne-Marie Lomenech, Marc Bonneu, Ali Gargouri, Noomen Hadj-Taieb. Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus Penicillium occitanisand use in juice clarification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Volume 127, May 2016, Pages 56-66. doi:10.1016/j.molcatb.2016.02.012. Available online 24 February 2016.*

II. Articles d'ouvrages scientifiques parus en 2015 : 0

BREVETS D'INVENTIONS DEPOSES EN 2015: 0

III. Diplômes

III.1. Habilitations: 0

III.2. Thèses

- 1) Emna Dabbeche: Rôle du système immunitaire et de la synthase du monoxyde d'azote de type 2 (NOS2) dans un nouveau modèle murin de mélanome rapidement évolutif. Implication pour les cancers humains. Soutenue Le 30 Novembre 2015 (Ecole d'Ingénieurs de Sfax & Faculté de Médecine Paris Descartes). (Encadreur : Pr. Raja Mokdad-Gargouri & Pr. Henri-Jean Garchon).
- 2) Yosra Kamoun: Effet de la surexpression de la thioredoxine et d'autres gènes de levure sur l'apoptose médiée par P53 chez Saccharomyces cerevisiae. Soutenue le 25 Décembre 2015 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Pr. Ali Gargouri).
- 3) Ines Ben Hmad: Production de cellulases fongiques de Stachybotrys microspora: purification, caractérisation biochimique de deux nouvelles endoglucanases et applications biotechnologiques. Soutenue le 28 Décembre 2015 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur: Pr. Ali Gargouri).

III.3. Mastères de recherche

- 1) Amine Jablaoui: Etude de l'effet inhibiteur d'une serpin bactérienne du microbiote intestinal luminal de patient atteint de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Soutenue le 22 Décembre 2015 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Dr. Imen Miladi & Dr Moez Rhimi.).
- 2) Nizar Akermi: Etude fonctionnelle des Serpins du microbiote intestinale. Soutenue le 22 Décembre 2015 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Pr. Ali Gargouri & Dr. Moez Rhimi).
- 3) Aicha Kriaa: Impact de la surexpression de la thiorédoxine réductase sur l'apoptose médiée par la protéine P53 chez la levure. Soutenue Janvier 2015 (Faculté des Sciences de Sfax). (Encadreur : Pr. Ali Gargouri & Dr. Yosra Kamoun).

III.4. Mastères spécialisés/professionnels

1) Ameni Belhassen: Valorisation des déchets agro-industriels et production de lipides d'intérêt par culture des levures oléagineuses. Soutenue le 10 Décembre 2015 (Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir). (Encadreur : Dr. Mohamed Guerfali).

III.5. Projets de Fin d'étude

- 1) Wided Akermi: Potentialités anti thrombotiques de molécules chimiques. Soutenu le 27/05/2015 (Faculté de science Gafsa). (Encadreur: Dr. Basma Hadjkacem).
- 2) Sfaxi Sirine: Etude de l'impact de l'oncoprotéine LMP1 DE Virus d'Epstein Barr sur le profil de méthylation de l'ADN. Soutenu le 13/06/2015 (Institut Supérieur de Biothechnologie de Sfax). (Encadreur: Dr.Waji Ayadi).
- 3) **Rihab Bouzouita:** Purification et caractérisation biochimique d'une polygalacturonase du mutant CT1 de Penicillium occitanis. (*Eole d'ingénieurs polytechnique privée de Sousse*). (Encadreur : Melle. Azza Hadj-Sassi).

VI- Projets de coopération

VI.1. Nationaux: 0

VI.2. Internationaux

- 1) Renouvellement du Projet de recherche dans le cadre de la coopération scientifique Tuniso Française (DGRS/CNRS) (Année 2014) pour l'année 2015 intitulé " Etude fonctionnelle du gène TTC 40 dans le cancer du nasopharynx " et sous le code 14/R 0801.
- 2) Renouvellement du Projet de recherche dans le cadre de la coopération scientifique Tuniso-Algérienne (Année 2012) pour l'année 2015 intitulé "Recherche et production d'enzymes d'intérêts agro-industriels chez des microorganismes autochtones".
- 3) Renouvellement du Projet de recherche dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso Française (PHC-Utique) (Année 2013) pour l'année 2015 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.
- 4) Renouvellement du Projet de recherche dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso Française (PHC-Utique) (Année 2014) intitulé "Rôle des serpins, inhibiteurs de protéases à serine, du microbiote digestif humain dans les maladies inflammatoires intestinales " et sous le code 14G 0816

LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB)

مخبر المبيدات البيولوجية

Responsable : Pr.slim TOUNSI

Email: slim.tounsi@cbs.rnrt.tn

LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	Grade	Nom et Prénom	Grade
		Etudiants	
Tounsi Slim	Professeur, Directeur du laboratoire	Zouari Imen	Doctorant
Rouis Souad	Maître de Conférences	Mhalla Dhekra	Doctorant
Kais Jamoussi	Maître de Conférences	Kahla Yosra	Doctorant
Hichem Azzouz	Maître de Conférences	Kharrat Marwa	Doctorant
Raida Zribi	Maitre Assistante	Zalila Imen	Doctorant
Olfa Frikha	Maitre Assistante	Ben Abdallah Dorra	Doctorant
Wafa Jallouli	Maitre Assistante	Abdelmalek Nouha	Doctorant
Fatma Driss Zouari	Maitre Assistante	Fatma Masmoudi	Doctorant
Karama Bouassida	Maitre Assistante, IPEIS	Damak Ines	Doctorant
Mariam Dammak	Maître Assistante, FSG	Hanen Dhouib	Doctorant
Dhikrayet Selmi	Technicienne	Mariam Hmani	Doctorant
Zina Salhi	Technicienne	Samar Makni	Doctorant
Fathi Hertelli	Technicien	Yosra Ben Salah	Doctorant
Saoussen Gafsi	Technicienne	Hajeur Mami	Doctorant
Ben Abdallah Sami	Ingénieur	Ibtissem Saidi	Doctorant
Jihen Elleuch	Ass-Contractuel, FSS	Imen Barhoumi	Doctorant
Hanen Boukédi	Post-Doc	Maryem Soudeni	
Saoussen Ben Khedr	Post-Doc	Rim Miladi Jihen Mseddi	
Dalel Ben Farhat	Post-Doc	Zohra Benkhoud Ahlem Ammar	Mastère de recherche
		Karima Khadraoui Hedia Salem	

OJECTIF GENERAL

L'objectif général du présent projet est de réaliser les étapes requises de recherche et développement devant mener à la mise en marché des biopesticides les plus prometteurs (efficaces contre les phytopathogènes et respectueux de l'environnement et de la santé humaine) pour les systèmes agricoles.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

Mettre au point des Biopesticides pour résoudre, à la carte, les problèmes causés par les ravageurs (insectes) et pathogènes (champignons et bactéries) des plantes. Les objectifs spécifiques suivants seront abordés :

1-Sélectionner des biopesticides (microorganismes ou produits naturels) les plus susceptibles d'être commercialisés.

2-Faire les études de laboratoire nécessaires pour compléter certaines exigences d'homologation des produits sélectionnés en I). Ces études porteront le cas échéant sur : 1) la mise à l'échelle de la production massive du produit; 2) la formulation du produit; 3) la compréhension du mode d'action du produit; 4) la compatibilité du produit envers les produits conventionnels phytosanitaires utilisés dans les systèmes agricoles retenus pour les essais.

3-Comparer l'efficacité des biopesticides avec les systèmes conventionnels (pesticides) ainsi qu'entre les biopesticides sélectionnés s'attaquant au même problème phytosanitaire.

INTITULE DES PROJETS DEVELOPPES

Les trois projets développés, convergent vers un seul et unique but à savoir la mise au point de biopesticides de différentes origines et natures, permettant de développer la lutte biotechnologique contre les ravageurs (insectes) et les pathogènes des plantes (bactéries et champignons) :

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

Responsable: Pr Slim Tounsi

Projet 2 : Etude et production de biofongicides d'origines microbienne et végétale

Responsable: Dr Kais Jamoussi

Projet 3 : Etude et production de Bactéricides d'origines microbienne et végétale

Responsable: Dr Olfa Frikha et Pr Slim Tounsi

RESUME DES RESULTATS OBTENUS

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

- 1- Bioinsecticides actifs contre les diptères
- 1-1- Identification de 2 nouveaux gènes de type cry40 et cry30E chez de nouveaux isolats

de B. thuringiensis

Dans le cadre de la recherche de nouvelles delta-endotoxines ayant de nouveaux spectres d'activités larvicides, nous avons pu identifier deux nouveaux gènes de type cry40 et cry30E

codant pour des toxines actives contre les Diptères. Nous avons réussi à amplifier, cloner et séquencer la totalité des deux gènes. La séquence de la protéine Cry40 a montré une homologie de 81 % avec la protéine Cry40 publiée. Celle de Cry30E a montré une homologie de 99,56 % avec Cry30Ea3. Par la suite, ces deux gènes ont été clonés dans des vecteurs d'expression. L'étude de leur expression et de leurs spectres d'activités est en cours.

1-2- Séquençage et analyse du génome d'une nouvelle souche de *Bacillus thuringiens* active contre *Aedes aegypti*

La souche BLB406 est un nouvel isolat de *Bacillus thuringiensis* ayant une activité larvicide contre *Aedes aegypti*. Suite à une investigation moléculaire utilisant la technique PCR-RFLP, nous avons confirmé qu'il s'agit d'une souche différente de la sous espèce *israelensis*. Dans le but d'identifier les potentialiés de la souche BLB406 dans le domaine des biopesticides, nous avons séquencé son génome par la technique « Next Generation Sequencing » (NGS). L'analyse des données NGS obtenus, nous a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs nouveaux gènes de type *cry60*, *cry65*, *cry22*, *vip1*, *vip2*, *vip3*. Vu le contenu original en gènes *cry* et *vip* et suite à l'analyse comparative de son génome avec ceux des souches de références publiées, BLB406 peut être considéerée comme une souche très prometteuse de *B. thuringiensis*.

2- Bioinsecticides actifs contre les lépidoptères :

2-1- Production, Formulation et Application des pesticides biologiques pour le traitement des agrumes

Dans le cadre d'une thèse mobidoc et en collaboration avec les industries pharmaceutiques MEDIS, nous avons entrepris le développement de toute la chaine de valeur relative à la production de biopesticides à forte activité insecticide contre des ravageurs des agrumes, dans l'objectif de la transférer du laboratoire à l'industriel. Deux lépidoptères ravageurs des agrumes : *Phyllocnistiscitrella* (mineuse des agrumes) et *Prayscitri* (teigne des agrumes) seront utilisés dans des tests de toxicité *in vitro* dans le but de cribler notre collection de souches de *B. thuringiensis* pour sélectionner une à forte activité insecticide. Ce travail sera réalisé en collaboration avec le Centre techniques des agrumes de Nabeul.

Dans le but de maitriser la chaine de production (par scale up) et d'améliorer les résultats déjà obtenus au laboratoire, des études de bilan de la matière ont été entreprises pour deux milieux de production : simple à base de glucose et complexe à base d'amidon. Deux modes de fermentations (Batch simple et Fed-Batch) ont été testés à l'échelle erlenmeyer. Le dosage de la quantité du glucose restante (S) dans le milieu de culture, durant 72h de cultures en Batch simple, a permis de déterminer la vitesse spécifique de la croissance de la souche BLB1 de *B. thuringiensis* par la suite. Le rendement en protéines (P) ainsi que la biomasse (X) de la souche, ont été aussi déterminés. L'augmentation de la production des delta-endotoxines a été trouvée proportionnelle à la diminution du taux du glucose dans le milieu. De plus, après 48h de culture, la biomasse se stabilise, en faveur de la production des toxines. Ces résultats ont permis de déterminer les constantes de croissance de BLB1 en milieu simple. Ainsi, la vitesse spécifique de croissance atteint son max (5,6 h⁻¹) après 4 à 6h de culture.

2-2- Effet du stade larvaire sur l'activité insecticide

Afin de déterminer le stade larvaire le plus sensible aux δ endotoxines de B. thuringiensis, deux stades (L1 et L5) de l'insecte E. kuehniella (insecte modèle du laboratoire) ont été étudiés, en utilisant la souche BLB1 (hypertoxique) et la souche BBP5 (productrice la

protéine Cry1Aa, non toxique contre *E. kuehniella*). Les tests de toxicité effectués ont montré que le stade L1 est le plus sensible aux toxines Cry. L'étude de l'effet histopathologique ainsi que les différentes étapes du mode d'action des protéines Cry a montré que, vue la faible activité protéasique du jus larvaire de L1, la forme active des toxines Cry persiste longtemps causant, par conséquence, plus d'effet destructif au niveau intestinal.

2-3- Amélioration de l'activité de *Bacillus thuringiensis* par co-expression des facteurs de virulence d'un nématode avec ses toxines endogènes:

Les domaines CCP et ShK appartenant respectivement aux protéases Sc-SP-3 et Sc-AST de S. carpocapsae, ont été choisis pour être co-exprimés avec la toxine Cry1Ac de la souche HD1 kurstaki de B. thuringiensis. Le choix de ces domaines a été fait selon leur potentiel insecticide démontré lors de leurs expression hétérologue chez Escherichia coli (Travail en collaboration avec Pr Simoes, Université d'Azores, Portugal). De plus, ils présentent deux voies d'action différentes : Le CCP actionne au cours de la transduction du signal et le ShK au niveau des canaux ioniques. Ces domaines ont été déjà mis en fusion avec le domaine C-terminal de Cry1Ac responsable de la cristallisation. Les vecteurs construits ont été introduits chez une cristallifère « HD1 » pour transformants HD1/pHShK::CT souche donner les HD1/pHCCP::CT, et chez la souche acristallifère « HD1cryB » pour donner les transformants HD1cryB/pHShK::CT et HD1cryB/pHCCP::CT.

Expression chez la souche cristallifère HD1

Une construction a été conçue de telle sorte que le domaine C-terminal de Cry1Ac, qui a été greffé aux domaines ShK et CCP, va leur favoriser l'aptitude à co-cristalliser avec les delta-endotoxines qui forment le cristal de HD1. Pour s'assurer de la réussite de cette démarche, une analyse de la composition des cristaux des transformants HD1/pHShK::CT et HD1/pHCCP::CT a été menée. Une analyse de la composition des cristaux par SDS-PAGE a été réalisée suite à l'extraction et la solubilisation des cristaux des souches recombinantes, présumées contenir les protéines de fusion Shk::CT et CCP::CT. Les cristaux de la souche HD1/pHTBlue portant le vecteur vide ont été extraits dans les mêmes conditions et ont été utilisés comme contrôle.

Sachant que les phases codantes des gènes de fusion *ShK::CT* et *CCP::CT* ont des tailles respectives de 1,755 et 1,8 kb, les protéines chimères qui en seront issues -suite à l'expression des gènes correspondants- seront de tailles approximatives de 64,9 et 66,6 kDa, respectivement. Face aux différences minimes de tailles avec la forme active de la toxine de la souche hôte (HD1) qui rendent leur détection difficile par un simple gel SDS-PAGE, une détection par voie immunologique était une alternative à tenter. Un Western Blot en utilisant comme anticorps l'Anti-Cry1Ac a donné des spots à 130 kDa pour toutes les souches (HD1/pHT*Blue*, HD1/pH*ShK::CT* et HD1/pH*CCP::CT*) qui correspondent, comme attendu, à une hybridation spécifique de l'anticorps avec la delta-endotoxine Cry1Ac. Des spots sont obtenus aussi pour une taille avoisinant 60 kDa. Le résultat n'était pas assez clair pour trancher s'ils s'agissent des protéines de fusion ou c'est simplement des hybridations avec le produit d'hydrolyse de la toxine 130 kDa. Une expression chez une souche acristallifère s'est imposée.

Expression chez la souche acristallifère HD1cryB

les vecteurs d'expression pHShK::CT et pHCCP::CT ont été alors introduits chez la souche mutante HDIcryB, qui est la dérivée acristallifère de la souche sauvage HD1, pour donner les transformants HDIcryB/pHShK::CT et HD1cryB/pHCCP::CT. Il convient de signaler que chez ces derniers il n'y aurait pas formation de cristaux et on estime avoir des corps d'inclusion comportant les protéines de fusion en agrégation (Song et al., 2008). Ceci amène à prendre la

réserve de mettre le terme « cristaux » entre guillemets, dans le cas des souches acristallifères transformées. L'analyse des Western Blots a montré que la piste contrôle correspondant à HD1*cryB*/pHT*Blue* ne comporte aucune bande témoignant de l'absence de toute protéine Cry. Cependant, des spots ont été observés dans les pistes correspondant aux transformants mais ayant des tailles un peu plus élevées que celles attendues (65 kDa). Des vérifications de ce résultat sont en cours. D'autre part, des anticorps dirigés contre les domaines ShK et CCP ont été commandés. Leur utilisation servira à lever les ambiguïtés obtenues lors de l'utilisation de l'anticorps Anti-Cry1Ac.

2-4- Clonage, expression et activité insecticide d'une métalloprotéase de *Bacillus* thuringiensis

Bacillus thuringiensis secrète au cours de la phase stationnaire une exoprotéase appelée InhA. Cette dernière est une métalloprotéase à zinc appartenant à la superfamille des metzincins. Elle se présente en une seule chaine polypeptidique de masse moléculaire d'environ 86 kDa. InhA contribue dans la virulence de B. thuringiensis vis-à-vis de larves d'insectes en dégradant les principaux peptides antimicrobiens de l'hôte.

Un criblage d'une vingtaine de souches de *Bacillus thuringiensis* a été effectué en utilisant la technique d'amplification PCR. Ceci a permis de montrer que toutes les souches étudiées hébergent au moins un gène de type *inhA*. L'application de la technique RFLP suivie par séquençage et étude par les outils Bioinformatiques a permis de classer les souches utilisées en 2 groupes. Le premier groupe est formé par neuf isolats hébergeant des gènes de type *inhA1*. Le deuxième groupe renferme onze souches hébergeant de nouveaux types de gènes *inhA*, dont certains sont non décrits dans la littérature.

Après avoir réussi l'amplification par PCR et le clonage du gène *inhA28* dans le vecteur de clonage pGEM-T-easy, nous l'avons séquencé. L'analyse des séquences nucléotidiques et en acides aminés de ce gène par les outils de Bioinformatiques ont montré qu'il s'agit d'un nouveau variant. Dans le but d'étudier l'expression du gène *inhA28* nous l'avons sous cloné dans le vecteur d'expression pBluescript II KS. La réussite de l'expression de cette métalloprotéase chez *E. coli* nous a permis d'étudier sa toxicité contre les larves de *Spodoptera littoralis*. Les résultats obtenus ont montré que cette métalloprotéase agit en synergie avec les protéines Cry contre *S. littoralis*.

PROJET 2: ETUDE ET PRODUCTION DE BIOFONGICIDES D'ORIGINES MICROBIENNE ET VEGETALE

1- Protection du blé contre Fusarium spp. par des souches de Bacillus spp.

En Tunisie, les céréales occupent une place importante dans l'économie nationale mais sa production en blé ne couvre qu'environ la moitié de ses besoins. Ces cultures sont exposées à diverses contraintes du milieu et à de nombreux stress environnementaux, notamment les maladies fongiques qui affectent ses composantes qualitatives et quantitatives. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des activités antifongiques de souches de *Bacillus amyloliquefciens*, *Bacillus subtilis* et *Paenibacillus polymyxa* nouvellement identifiées au laboratoire et à la protection du blé contre des champignons phytopathogènes essentiellement *Fusarium* spp. Une investigation par PCR a montré la présence des gènes codants pour les surfactines, les fengycines, les iturines, la fusaricidine et la polymyxine. La comparaison de l'efficacité des 3 espèces de *Bacillus* identifiées a montré l'efficacité des fractions sécrétées et

des cellules bactériennes dans la protection du blé aussi bien contre la fonte des semis que la fusariose des tiges et feuilles causées par *Fusarium graminearum*. La combinaison des souches bactériennes a montré une meilleure protection du blé.

2- Protection du pommier contre les maladies fongiques (Travail en collaboration avec UR13AGR03, Cultures maraichères biologiques et conventionnelles, Institut Supérieur Agronomique de Chott Mariem)

Le dépérissement du pommier constitue le problème phytosanitaire le plus grave dans les vergers de pommier en Tunisie. Les symptômes se présentent sous forme d'un dessèchement localisé qui débute à partir des jeunes pousses et qui évolue progressivement pour envahir la plante entière. Ces sujets se caractérisent par un développement anormal marqué par un nanisme et manque de vigueur. Des travaux antérieurs, réalisés au laboratoire de Phytopathologie de l'ISA-CM, ont révélé la présence d'un complexe fongique de Pythiacées incluant les espèces suivantes: *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora unindata*, *Phytophthora dreschlera*, *Pythium sterilum*, *Pythium irregulare*, *Pythium undulatum*, *Pythium indigoferae* et *Pythium rostratifigens*. D'où, l'objectif de ce travail de recherche est d'étudier la réponse de plusieurs espèces des genres *Phytophtora* et *Pythium* identifiées au laboratoire de Phytopathologie et inféodées au pommier vis-à-vis d'une collection de champignons (UR13AAGRO03) et de bactéries antagonistes (Laboratoire des Biopesticides) *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Ce criblage a permis d'identifier deux souches bactériennes et une fongique qui ont montré de fortes activités insecticides contre les Pythiacées du pommier.

3- Optimisation de la production de Biofongicides

Le succès et l'extension de l'utilisation de biofongicides plus respectueux de l'environnement dépendent non seulement des nouveaux agents de lutte biologiques mais de produits ou organismes plus prometteurs et performants. Dans ce cadre, nous nous sommes fixés pour objectif d'améliorer le potentiel de *B. amyloliquefaciens* BLB369. Nous avons étudié le comportement de la souche BLB369 sur différents milieux de cultures, ce qui nous a permis de repérer un milieu de base MOLB. Par la suite, nous avons appliqué la méthodologie des plans d'expériences pour la production de biofongicides tout en considérant deux sous produits de l'industrie agro-alimentaire (un sous produit d'une industrie de confiserie et un extrait de thon) comme sources d'énergie et d'azote. Nous avons criblé les facteurs influant la production de l'activité antifongique et nous examinons le maximum de production de l'activité antifongique par la stratégie du « central composite designs » afin de mettre au point un milieu synthétique optimal.

4-Activité antifongique de la souche V26 de B. subtilis

L'activité antifongique du biosurfactant de la souche V26 de *B. subtilis* a été évaluée contre une gamme de champignons phytopathogènes. En effet, nous avons remarqué une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternate* avec des zones d'inhibitions variant de 20 à 30 mm et des valeurs de CMI variant entre 0,039 et 0,625 mg/ml. Aucune activité antagoniste n'a été enregistrée contre *Aspergillus flavus*.

PROJET 3: ETUDE ET PRODUCTION DE BACTERICIDES D'ORIGINES MICROBIENNE ET VEGETALE

I- Les antibiotiques de la souche 32a de Bacillus amyloliquefaciens

Dans un travail antérieur, nous avons montré que la souche 32a de *Bacillus amyloliquefaciens* présente une forte 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 l'interaction entre la souche 32a et la souche d'*A. tumefaciens* C58. La

capacité de la souche 32a à contrôler ce pathogène *in vivo* a été étudiée. La souche 32a montre une protection totale des plantes de tomate contre le pathogène d'A. *tumefaciens* C58 par rapport au témoin infecté non traité. La souche 32a contrôle efficacement la maladie de la galle du collet, avec un indice de biocontrôle (de 100,0%) meilleur que celui obtenu avec la souche de biocontrôle K1026 (86,6%).

Pour mieux comprendre l'origine de la protection totale observée par la souche 32a contre le pathogène C58, la population du pathogène au niveau des blessures en absence et en présence de la souche antagoniste a été déterminée à différents temps après la bactérisation. Une chute significative des cellules du pathogène a été observée chez les plantes traitées en comparaison avec les témoins infectés non traités. Ainsi, l'efficacité de la souche 32a dans la lutte contre la maladie de la galle du collet est probablement associée à la diminution importante de la population pathogène.

II- Le biosurfactant de la souche V26 de Bacillus subtilis

Dans le but de déterminer le spectre d'activité antibiotique, le biosurfactant de la souche V26 de *B. subtilis* a été testé contre une série de souches bactériennes pathogènes pour l'homme et l'environnement. Suite à ce criblage, il s'est avéré que le biosurfactant V26 est actif sur *B. cereus* et *B. subtilis* (ATCC 6633) avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) respective de l'ordre de 0,625 mg/ml et 0,312 mg/ml. Par contre, aucune activité n'a été enregistrée sur Staphylococcus aureus et Micrococcus luteus et les bactéries pathogènes à Gram-étudiées sauf pour Agrobacterium tumefaciens.

Production scientique et

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

- 1) H. Azzouz, J. Kebaili-Ghribi, F. Daoud, N. Abdelmalak, K. Ennouri, N. Belguith-Ben Hassan, S. Tounsi and S. Rouis (2015) Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against pyralid stored-product pests. J. Appl. Entomol. doi: 10.1111/jen.12205.
- **2)** Ben Abdallah D, Frikha-Gargouri O, Tounsi S. (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. J Appl Microbiol. doi: 10.1111/jam.12797.
- 3) Elleuch J, Tounsi S, Ben Hassen NB, Lacoix MN, Chandre F, Jaoua S, Zghal RZ. (2015) Characterisation of novel Bacillus thuringiensis isolates against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) and Ceratitis capitata (Diptera: Tephridae). J Invertebr Pathol. 124:90-97. doi: 10.1016/j.jip.2014.11.005.
- 4) Boukedi H, Khedher SB, Triki N, Kamoun F, Saadaoui I, Chakroun M, Tounsi S, Abdelkefi-Mesrati L (2015) Overproduction of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin and study of its insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. J Invertebr Pathol. doi: 10.1016/j.jip.2015.03.013.
- 5) Monia Aouali Dhekra Mhalla Fatma Allouche Laurent El Kaim Slim Tounsi Mohamed Trigui Fakher Chabchoub (2015) Synthesis, antimicrobial and antioxidant activities of imidazotriazoles and new multicomponent reaction toward 5-amino-1-phenyl[1,2,4]triazole derivatives. Med Chem Res DOI 10.1007/s00044-015-1322-z.
- 6) Abdelmalek Nouha, Sellami Sameh, Frikha Fakher, Tounsi Slim, Rouis Souad (2015) Impact of Q139R substitution of MEB4-Cry2Aa toxin on its stability, accessibility and toxicity against *Ephestia kuehniella*. International Journal of Biological Macromolecules 81: 701–709.
- 7) Jihen Elleuch, Raida Zribi Zghal, Ines Ben Fguira, Marie Noël Lacroix, Jihed Suissi, Fabrice Chandre, Slim Tounsi, Samir Jaoua (2015) Effects of the P20 protein from *Bacillus thuringiensis israelensis* on insecticidal crystal protein Cry4Ba. International Journal of Biological Macromolecules 79: 174–179.
- 8) Ines Dammak, Mariam Dammak, Slim Tounsi (2015) Histopathological and combinatorial effects of the metalloprotease InhA1 and Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera littoralis*. International Journal of Biological Macromolecules 81: 759–762.
- 9) Olfa Kilani-Feki, Saoussen Ben Khedher, Mouna Dammak, Amel Kamoun, Hayfa Jabnoun-Khiareddine, Majda Daami-Remadi, Slim Tounsi (2016) Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. Biological Control 95: 73–82.
- **10**) Mariam Dammak, Saoussen Ben Khedher, Hanen Boukedi, Ikbel Chaib, Asma Laarif, Slim Tounsi (2016) Involvement of the processing step in the susceptibility/tolerance of two lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. Pesticide Biochemistry and Physiology 127: 46–50.

- 11) Saoussen Ben Khedher, Olfa Kilani-Feki, Mouna Dammak, Hayfa Jabnoun-Khiareddine, Mejda Daami-Remadi, Slim Tounsi (2015) Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. C. R. Biologies 338: 784–792.
- **12**) Sameh Sellami, Maroua Cherif, Lobna Abdelkefi-Mesrati, Slim Tounsi, Kaïs Jamoussi (2015) Toxicity, Activation Process, and Histopathological Effect of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3Aa16 on Tuta absoluta. Appl Biochem Biotechnol. 175:1992–1999.
- 13) Jihen Elleuch, Raida Zribi Zghal, Marie Noël Lacoix, Fabrice Chandre, Slim Tounsi, Samir Jaoua (2015) Evidence of two mechanisms involved in *Bacillus thuringiensis israelensis* decreased toxicity against mosquito larvae: Genome dynamic and toxins stability. Microbiological Research 176: 48–54.
- **14**) Hanen Boukedi, Slim Tounsi, Lobna Abdelkefi-Mesrati (2016) Abiotic factors affecting the larvicidal activity of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin against the lepidopteran pest *Ephestia kuehniella*. Journal of Plant Diseases and Protection. DOI 10.1007/s41348-016-0004-5.
- **15**) Saoussen Ben Khedher, Hanen Boukedi, Olfa Kilani-Feki, Ikbel Chaib, Asma Laarif, Lobna Abdelkefi-Mesrati, Slim Tounsi (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. Journal of Invertebrate Pathology 132: 42–47.
- **16**) Abdelmalek N, Sellami S, Ben Kridis A, Tounsi S, Rouis S (2015) Molecular characterisation of *Bacillus thuringiensis* strain MEB4 highly toxic to the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Pest Manag Sci. doi: 10.1002/ps.4066.
- 17) Karim Ennouri, Hanen Ben Hassen, Nabil Zouari (2015) Statistical Analysis of Cultural Parameters Influencing Delta-Endotoxins and Proteases Productions by *Bacillus thuringiensis kurstaki*. Arab J Sci Eng, DOI 10.1007/s13369-015-1722-x.
- **18**) Hanen Boukedi, Sameh Sellami, Sonia Ktari Najeh, Belguith-Ben Hassan Tahya, Sellami-Boudawara, Slim Tounsi, Lobna Abdelkefi-Mesrati (2016) Isolation and Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. *Microbiological Research*. DOI: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.micres.2016.02.004.
- 19) Dorra Ben Hamadou-Charfi & Annette Juliane Sauer & Lobna Abdelkafi-Mesrati & Samir Jaoua & Dietrich Stephan (2015) Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies Against the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3Aa16. Appl Biochem Biotechnol., 175:2357–2365.
- **20**) Sellami S, Jamoussi K (2016) Investigation of larvae digestive β-glucosidase and proteases of the tomato pest *Tuta absoluta* for inhibiting the insect development. Bull Entomol Res., 22:1-9.
- **21**) Sellami S, Cherif M, Jamoussi K (2016) Effect of adding amino acids residues in N- and C-terminus of Vip3Aa16 (L121I) toxin. J Basic Microbiol. doi: 10.1002/jobm.201500712.
- **22)** Lobna Bouchaala, Saoussen Ben Khedher, Héla Mezghanni, Nabil Zouari and Slim Tounsi (2015) Bayesian network and response surface methodologgy for prediction and improvement of bacterial metabolite production. IEEE, SNPD 2015, June 1-3 2015, Takamatsu, Japan
- 23) Sameh Sellami, Maroua Cherif, Samir Jaoua, and Kaïs Jamoussi (2015) Chimeric vip3Aa16TC Gene Encoding the Toxic Core of the Vegetative Insecticidal Protein Enhanced *Bacillus thuringiensis* Entomopathogenicity. Tunisian Journal of Plant Protection 10:15-22.
- **24**) Sellami, S., Tounsi, S., Jamoussi, K. (2015) La lutte biologique, alternative aux produits phytosanitaires chimiques Revue bibliographique. J. New Scien. Agri. Biotech. 19, 736-743.
- **25**) Ben Mahmoud A., Ben Mansour R., Driss Fatma, Baklouti-Gargouri S., Siala O., Mkaouar-Rebai E. et Fakhfakh F. (2015) Evaluation of the effect of c.2946+1G>T mutation on splicing in the SCN1A gene. Computational Biology and Chemistry. 54, 44-48.

FORMATION DIPLOMANTE:

Habilitation:

Hichem Azzouz : Habilitation universitaire en sciences biologiques soutenue le 22/05/2015 à la Faculté des Sciences de Sfax.

Titre : Vers une alternative de lutte contre les ravageurs des cultures

Mastère :

Wassim Guidara : Mastère en Biotechnologie microbienne, soutenue le 6 novembre 2015 à la Faculté des Sciences de Sfax.

Titre : Contribution à la valorisation des eaux usées pour la production des biopesticides de *Photorhabdus temperata*

BREVETS:

1: « Isolement et caractérisation d'une nouvelle souche de *Bacillus thuringiensis* active contre les lépidoptères »

INVENTEURS: Hanen Boukédi, Lobna Abdelkéfi-Mesrati et Slim Tounsi

2 : Pouvoir hémostatique et cicatrisant d'Urtica dioica

INVENTEURS : Karama Zouari Bouassida, Meriem Khmiri, Yosra Kahla, Samar Makni, Sana Bardaa, Mohamed Trigui et Slim Tounsi

MISSIONS

- Slim Tounsi: 8-02-2015 au 14-02-2015 à Montpellier, France. Mission dans le cadre du projet AUF.
- Slim Tounsi : du 6 au 10 septembre 2015 à Berlin, Allemange. Mission dans le cadre du projet PASRI.
- Slim Tounsi : du 10 au 13 novembre 2015 à Blida, Algérie. Invitation du comité d'organisation du symposium international sur la valorisation de plantes aromatiques et médicinales dans la méditerranée.
- Slim Tounsi: du 20-07-2015 au 26-07-2015 à Alicante, Espagne. Mission dans la cadre du projet CINEA.
- **Souad Rouis** : du 29 au 31 octobre 2015 à Valence, Espagne. Mission pour présider le jury de thèse de Maissa Chakroun
- Souad Rouis: du 06 au 10 septembre 2015, Visite d'étude à Berlin (Allemagne), dans le cadre du projet PASRI
- **Souad Rouis** : du 5 au 8 octobre 2015 à Montpellier, France. Mission dans le cadre du projet PASRI
- **Souad Rouis**: du 31 Aout au 4 Septembre 2015 à Lyon, France. Mission dans le cadre d'une visite d'étude à la structure Accinnov (Lyon biopole).

STAGES EFFECTUES A L'ETRANGER

- **Dorra Ben Abdallah** : 02-11-2015 au 02-12-2015, Laboratoire Pro BioGem, Université de Lille, France.
- Marwa Kharrat : Stage à l'Université de Saint-Joseph, Beyrouth, Liban: 15-03-2015 au 15-04-2015.

ORGANISATION DE MANIFESTATION

Organisation d'une Journée sur le transfert technologique : 14-04-2015 au Centre de Biotechnologie de Sfax.

OBTENTION DE PRIX

-2^{ème} Prix du concours Univenture 2015

CONVENTION DE COLLABORATION:

Le laboratoire a signé deux conventions de collaboration avec :

- -Wiki Start-Up: Une convention d'accompagnement en termes de transfert de technologie.
- -La société GAPRIM productrice de tomates : une convention pour l'optimisation de la protection de la tomate contre l'insecte ravageur *Tuta absoluta* en utilisant les biopesticides de notre laboratoire.

LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes

(LBAP)

مخبر البيوتكنولوجيا وتحسين النباتات

Responsable : Pr. Faiçal BRINI

Email: faical.brini@cbs.rnrt.tn

LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Enseignants-chercheurs (corps A: 04)

- -Faiçal BRINI, Maitre de Conférences, Directeur du Laboratoire (CBS)
- -Habib KHOUDI, Maitre de conférences (CBS)
- -Moez HANIN, Professeur (CBS/ISBS)
- -Mondher Mejri, Maitre de Conférences (CBS/ISB-Bèja)

Enseignants-chercheurs (corps B : 07)

- -Inès YAKOUBI, Maitre Assistant (CBS)
- -Walid SAIBI, Maitre Assistant (CBS)
- -Chantal EBEL Maitre Assistant (CBS/ISBS)
- -Mouna CHOURA, Maitre Assistant (CBS)
- -Rania BEN SAAD, Maitre Assistant (CBS)
- -Mohamed Nejib SAIDI, Maitre Assistant (CBS)
- -Ikram ZAIDI, Maitre Assistant (CBS)

Cadres ayant un grade équivalent ou homologue au grade d'assistant de l'enseignement supérieur: (07)

- -Siwar Ben AMAR, Post-doc
- -Mouna GHORBEL, Post-doc
- -Kaouther FEKI, Post-doc
- -Imen AMARA, Post-doc
- -Sandra GOUIAA, Post-doc
- -Abdelmajid BEN ABDENNOUR, Ingénieur Principal
- -Malika AYADI, Ingénieur Principal

Doctorants (Thèses de doctorat es-sciences): (15)

Sana Tounsi
 Marwa Drira
 Héla Safi
 Rania Jmal
 Habib Mahjoubi
 Asma Ben Feki
 Mariem Braidai
 Sana Koubaa
 Sahar Sellami

- Fatma Boukid - Wiem Meddeb - Olfa Lenglize Ridden

Etudiants en Mastère: (02)

-Hassiba Bouazzi - Marwa Harbaoui

Cadre Technique: (04)

Chadya Boughanmi, Technicien Supérieur

Sawssen Kteta, Technicien du Laboratoire (Contractuelle)

Sarra Namani, Attaché administratif/ Secrétaire

Mohammed Ibrahmi, Agent de Laboratoire

OBJECTIFS GENERAUX

Le Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes a pour objectif le Développement de nouvelles variétés de céréales plus tolérantes aux conditions de l'environnement et ayant une meilleure qualité et rentabilité industrielle.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

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.

Le LBAP vise l'identification de gènes candidats impliqués dans la tolérance aux stress à partir du blé et leur validation fonctionnelle dans des plantes transgéniques modèles (Arabidopsis, tabac) et l'exploration et la valorisation de certaines macromolécules de stress et composés phénoliques à haute valeur ajoutées pour des applications biotechnologiques bien étudiées.

LISTE DES PROJETS PRINCIPAUX RESULTATS

<u>Projet 1 :</u> Gènes candidats de la tolérance aux stress abiotiques : Isolement, pyramidage et expression chez des plantes d'intérêt économique

Action 1/ Effet de l'expression du gène TdSHN1, codant pour un facteur de transcription (ERF) de blé dur, sur la tolérance des plantes aux stresses abiotiques

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. Précédemment, nous avons rapporté l'isolement d'un cDNA, chez le blé dur, codant pour un ERF (TdSHN1). L'expression de cet ERF est fortement modulée par le stress salin, hydrique, froid et hormonal. Ce travail a été poursuivi par l'introduction de ce gène (TdSHN1) dans le génome de tabac afin d'évaluer son potentiel à conférer la tolérance au stresses abiotiques. Pour cela, les lignées transgéniques ont été soumises au stress salin et hydrique. Les résultats ont montré que le nouveau ERF permet une meilleure tolérance au stress salin et hydrique.

Action 2/ Les Facteurs de transcription de type NAC

L'objectif de la présente action est d'identifier les membres de la famille de facteurs de transcription de type NAC chez le blé dur à partir des bases de données transcriptomiques disponibles publiquement. Ensuite, sélectionner des gènes candidats (GC) impliqués dans la réponse au stress biotique et/ou abiotique à l'aide des analyses phylogénétiques et des études de leurs profils d'expression *in silico*. Finalement, une analyse d'expression par RT-PCR quantitative de ces gènes candidats lors des stress salin et hydrique, est envisagée pour confirmer leur rôle dans la réponse à ces stress chez un génotype tolérant de blé dur (Om Rabiaa). Des données issues de séquençage de transcriptome de blé ont permis d'identifier les gènes codant pour des protéines NAC. En effet, 165 séquences non redondantes avec un domaine NAC complet ont été identifiées. Ces gènes ont été soumis à des analyses phylogénétiques pour comparer les séquences de blé dur avec ceux d'autres plantes monocotylédones (Riz et Orge) et dicotylédones (*Arabidopsis* et vigne). Une localisation chromosomique de ces gènes en utilisant les séquences du génome de blé tendre comme référence a été effectué et a permis en plus d'identifier les gènes provenant d'évènements de duplication de régions chromosomiques. Des

outils de génomique fonctionnelle et bioinformatiques ont été mis à contribution afin d'analyser l'expression des gènes NAC à partir des données microarray de blé dur et de blé tendre disponibles publiquement. En se basant sur les analyses phylogénétiques et les donnés microarray, cinq gènes candidats ont été sélectionés pour effectuer une étude d'expression par RT-PCR. Cette dernière, a montré que quatre gènes sont modulés par le stress salin et trois autres par le stress hydrique. Les profils d'expressions obtenus par RT-PCR corroborent les résultats obtenus par étude d'expression *in silico*. En outre, un gène (NAC47) a montré un profil d'expression spécifique aux racines sous divers stress. Ce dernier a été sélectionné pour des études fonctionnelles *in planta*.

Action 3/ Effet de la co-expression d'un antiporteur de sodium et d'une pompe à proton sur la biofortification en potassium de la tomate

Le potassium (K) est élément essentiel pour les plantes et les humains. Malgré cette importance, l'OMS et la FAO considèrent que la déficience en K est un problème très répandu dans le monde et recommandent une augmentation de 50 % du contenu en K des cultures. Nous avons produits des plantes transgéniques de tomate co-exprimants un antiporteur potassium/sodium, TNHXS1, et une pyrophosphatase, TVP1 à l'aide d'une construction bicistronique. En plus d'avoir une meilleure tolérance au stress salin comparativement aux plantes non transformées, les analyses minérales ont révélé que les fruits des plantes transgéniques accumulent significativement plus de K et moins de sodium que leurs homologues sauvages. Nos résultats ont démontré clairement l'importance de la construction bicistronique comme outil pour l'amélioration de la tolérance au sel et la biofortification des cultures d'intérêt économique.

Action 4/ Exploitation du potentiel génétique d'une graminée halophyte (A. littoralis) pour l'amélioration de la tolérance du blé dur aux stress abiotiques

Aeluropus littoralis est une monocotylédone halophyte de type C4 appartenant au genre Aeluropus Trin, Clorideae. Dans le but d'améliorer la tolérance de certaines variétés de blé aux stress abiotiques, nous avons utilisé A. littoralis comme source de gènes ayant un rôle dans les mécanismes de tolérance à ce type de stress. Afin d'atteindre ce but, une analyse du transcriptome différentielle chez la plante halophyte A. littoralis a permis d'isoler 492 ESTs dont 30 ESTs ayant un profil d'expression très significativement relié aux stress salin et hydrique (RE≥10). En utilisant la technique RACE-PCR, 23 gènes complets à partir des 30 ESTs analysés ont été isolés par real-time qPCR. L'analyse des séquences des gènes sur NCBI a montré que 11 gènes n'ont aucune homologie avec des séquences connues dans les bases de données de protéines et peuvent être considérées comme des nouveaux, alors les 12 autres gènes ont des fonctions connus. Parmi ces derniers il y a 3 gènes que nous avons sélectionnés pour étudier leurs fonctions : 1/ Un gène qui code pour une protéine appartenant à la famille « A20/AN1 zinc finger protein ». Ce gène a été nommé AlSAP4 dont l'expression et modulé par les divers stress (salinité, osmotique, ABA, SA, basse et haute température) aussi bien dans les feuilles que dans les racines. 2/ Un gène qui code pour une protéine appartenant à la famille « NAC transcription factor ». Ce gène a été nommé AlNAC. Ce gène est induit par la salinité, le stress osmotique, la basse et haute température mais il est sous exprimé par les stress hormonaux (ABA et SA). 3/ Un gène qui code pour une protéine de type 14.3.3. Ce gène a été nommé Al14.3.3. Les protéines 14.3.3 sont exprimées de façon ubiquitaire chez la plupart des eucaryotes. Elles sont dépourvues d'activités enzymatiques mais capables de se lier et de réguler diverses cibles (facteurs de transcription, enzymes, protéines du cytosquelette, etc.). Ces interactions dépendent de l'état de phosphorylation des protéines cibles. D'autre part, l'étude d'expression par qRTPCR a montré que le gène *Al14.3.3* est surexprimé au stress salin, osmotique et à l'ABA et réprimé en réponse par le froid et la chaleur. Son expression est constitutive au stress biotique. Ces trois gènes seront introduits chez le tabac pour voir leurs rôles dans la réponse aux stress hydrique et salin.

Projet 2: Voies de signalisation et tolérance aux stresses chez les plantes

Action 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

Les MAPKs (mitogen activated protein kinases) jouent un rôle déterminant dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Le bon fonctionnement de ces MAPKs nécessite l'intervention de protéines phosphatases telles que les MAPK phosphatases (MKP) qui déphosphorylent à la fois les résidus sérine/thréonine et tyrosine des MAPK cibles. Nous avons démontré au par avant que TMKP1 interagit avec la CaM de manière Ca²⁺ dépendante. Cette interaction résulte en une stimulation de l'activité phosphatase de TMKP1 in vitro mais seulement en présence des ions Mn²⁺ qui agissent comme cofacteur sur la phosphatase de blé. Au cours de cette action, nous avons poursuivi l'étude de la fonction de TMKP1 ainsi que son implication dans la réponse d'*Arabidopsis* aux stress biotiques et abiotiques.

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

A travers le logiciel scansite 3 (http://scansite3.mit.edu/), un motif conservé de liaison aux 14-3-3 de type I a été identifié au niveau de la position 574-580 (KLPSLP) de la protéine TMKP1. A fin de vérifier si TMKP1 et les protéines 14-3-3 peuvent interagir, des essais de co-immuno-précipitation (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 et des protéines 14-3-3 peuvent faire partie d'un même complexe *in vivo*. Des tests d'activité phosphatase ont montré que TMKP1 augmente en présence de différentes isoformes de 14-3-3.

1.2 Etude du rôle du TMKP1 dans la réponse au stress salin

Dans le cadre de l'étude fonctionnelle de TMKP1, des plantes transgéniques sur-exprimant TMKP1 ont été produites. Nos résultats montrent que la surexpression de TMKP1 améliore la tolérance au stress salin et plus particulièrement le LiCl. Pour investiguer la base physiologique de cette tolérance au stress, plusieurs paramètres (teneurs en MDA, activités anti-oxydantes comme la catalase, superoxyde dismutase et la peroxydase) ont été mesurés. Ces mesures ont révélé que l'amélioration de la tolérance des plantes transgéniques au lithium et au stress salin est liée à une plus forte activité anti-oxydante et une faible accumulation de MDA diminuant ainsi le taux des composés oxygénés réactifs (ROS). L'ensemble de ces résultats montre que TMKP1 joue le rôle d'un régulateur positif de la tolérance au stress salin chez le blé.

Action 2/ Exploration du rôle de l'acide phytique dans la réponse de la plante à une carence en phosphore

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

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. 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 LBAP 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 démontré précédemment que la phytase PHY US417 ajoutée au milieu ou produite par des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* a la capacité de stimuler la croissance des plantes sur un milieu de culture dépourvu en P et contenant l'acide phytique (AP). D'autres expériences nous ont aussi permis de conclure que l'AP intervient dans la régulation de l'homéostasie et la signalisation du phosphate et du sulfate. De plus, une forme secrétée de la phytase bactérienne a été clonée et transférée chez *Arabidopsis*. Les analyses physiologiques ont montré que la phytase ePHY secrétée par les racines des plantes transgéniques, est capable de mobiliser le Pi à partir du phytate présent dans le milieu extérieur, permettant ainsi une meilleure croissance de celles-ci et aussi d'autres plantes cultivées sauvages dans le même milieu (*Arabidopsis* et Tabac).

2.2 Développement d'une approche génétique pour générer de nouvelles variétés d'orge à faible teneur en phytate et plus riche en Pi

L'orge, l'une des principales céréales utilisées en alimentation animale, contient des concentrations élevées de phytate qui représente la forme majeure de stockage de phosphore (P). Le phytate possède de nombreuses propriétés anti-nutritionnelles. D'où la nécessité de supplémenter les aliments des animaux monogastrique avec du P inorganique ou avec des phytases (enzymes qui hydrolysent des phytates) pour subvenir aux besoins de l'animal en P. Cette situation entraine une forte accumulation dans le sol de P provenant des fientes très chargé en phosphore excrété par les animaux ce qui provoque de sérieux problèmes de pollution de l'environnement. Pour faire face à ces problèmes, nous proposons ici de développer une approche permettant de générer par mutagénèse de nouvelles variétés d'orge à faible teneur en phytate et plus riches en Pi, et qui peuvent être incorporés dans des produits alimentaires destinés à la nutrition animale. Tout d'abord, on a déterminé la teneur en acide phytique dans les graines d'orge de 6 variétés disponible à savoir (Rhihane, Swihli, Arbi Asyad, Lemssi, Manel, Faiez). La variété Rhihane présente la quantité la plus élevé d'acide phytique. De plus, on a déterminé la quantité du Pi présente dans ces graines en se basant sur une méthode colorimétrique (HIP: Assay for high phosphat method). Cette méthode va être utilisée dans des études ultérieures pour identifier les graines à faible teneur en phytate. On a montré que Faiez contient la teneur la plus élevée en Pi, cette variété montre aussi une activité phytasique plus élevée que les autres. Par la suite, la variété Rhihane a été utilisée pour faire des mutations aléatoires par l'azide de sodium à une concentration de 10 mM. Les graines mutagénisées ont été semées pour produire les parents M1, les graines M2 et M3 et ces dernières seront prochainement criblées par la méthode HIP citée plus haut pour identifier celles ayant des teneurs plus élevées en Pi.

Action 3/ Essais d'amélioration de la productivité végétale en conditions de stress chez le blé via un régulateur du cycle cellulaire.

3.1 Isolement du gène TdRL1 de blé, impliqué dans le contrôle cellulaire

Parmi les gènes candidats présents au sein du Laboratoire de Biotechnologie et 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 (<u>rice salt-sensitive 1</u>) est hypersensible au stress salin. 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) de par la liaison de la protéine cdc20 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. Nous avons isolé l'orthologue de RSS1 à partir de deux variétés tunisiennes de blé dur. Cette protéine, nommée TdRL1 (*Triticum durum* RSS1-like 1) présente au niveau de sa structure primaire toutes les caractéristiques de la protéine RSS1 à savoir des D-Box et un motif WAGE. Parmi les motifs identifiés seuls les D-box sont connus pour permettre l'adressage des protéines vers la dégradation via le protéasome. Ces différentes protéines montrent aussi un index hydrophobicité bas ce qui suggère une grande flexibilité structurale caractéristique des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP). Par expression de TdRL1 sous forme recombinante et sa migration en gel SDS-PAGE, nous avons pu montrer que sa migration est retardée en conditions dénaturantes, confirmant le caractère désordonné de TdRL1.

3.2 Implication de TdRL1 dans la réponse aux stress abiotiques

Par ailleurs, nous avons pu montrer que TdRL1 intervient dans l'amélioration de la tolérance des levures au stress salin et à la chaleur. Nous avons, en effet, sur-exprimé TdRL1 sous le contrôle d'un promoteur galactose dans des levures sauvage et des levures mutantes hypersensibles à la chaleur et au NaCl. Par rapport aux transformants contrôles (vecteur vide), les transformants sur-exprimant TdRL1 montrent une croissance accrue en conditions de stress. Pour comprendre le rôle de TdRL1 dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques, nous avons transformé la plante modèle *A. thaliana* par des constructions permettant la sur-expression de TdRL1 en fusion avec des étiquettes GFP, RFP, HA. Différentes lignées ont été obtenues qui sur-expriment TdRL1. Les premières analyses de certaines lignées montrent un accroissement du pouvoir germinatif en conditions de stress salin et ionique indiquant que TdRL1 participe à l'amélioration de la tolérance aux stress.

<u>Projet 3:</u> Evaluation des potentialités (tolérance aux contraintes abiotiques et qualité) des variétés Tunisiennes de blé dur (variétés améliorées et landraces) et Développement-utilisation des marqueurs moléculaires pour l'amélioration variétale de blé dur

Le maintien de la diversité génétique des plantes cultivées en général et le blé dur en particulier via la préservation des ressources naturelles et biologiques, ont promu leur culture sur le plan international. Cependant, à l'échelle Tunisien et jusqu'à nos jours la majorité des variétés améliorées de blé dur ont fait recours à « des génotypes fondateurs » déjà exploités/utilisés par les programmes internationaux d'amélioration comme ICARDA et CIMMYT. Ce projet et à travers ses différentes actions vise tout d'abord à former une collection du blé dur représentative du « germoplasme » Tunisien, la deuxième étape est la caractérisation de cette dernière de point de vue agronomique, morpho-physiologique, moléculaire et aussi évaluation de ses potentialités physicochimiques et technologiques. Ce projet permettra de valoriser certaines variétés/landraces, écartées depuis un bon moment des programmes Tunisiens d'amélioration de blé à cause de leurs faibles rendements. Au cours de l'année 2015-2016 seulement certaines actions ont progressé alors le reste sont en cours. Le développement de ce travail a nécessité la collaboration avec ESAK (Ecole Supérieure d'Agriculture de Kef) pour les différents essaies en plein champs.

Action 1/ Formation d'une collection de blé dur Tunisien (CBS Durum Wheat Collection) et son évaluation agronomique en plein champs

Au cours de la réalisation de ce projet, le premier problème rencontré est la disponibilité et l'authenticité du matériel végétal. C'est pourquoi la première année de ce projet a été consacrée pour la multiplication et l'épuration de certaines « variétés locales » de blé dur et des variétés couramment utilisées par les agriculteurs afin de former le CBS « durum wheat collection ». Cette collection sera le pilier de tout le travail durant ce contrat programme. Cette dernière a été

aussi enrichie par des accessions algériennes connues pour leur tolérance à certaines contraintes abiotiques (sécheresse-salinité). La multiplication et l'épuration ont été faites conjointement au niveau de la station expérimentale d'ESAK (Ecole Supérieur d'Agriculture du Kef par le DR. Rouma Sayar) et aussi au niveau de la serre du CBS.

Action 2/ Caractérisation moléculaire de la « CBS Durum wheat collection » via les marqueurs moléculaires SSR-SNP (neutres /fonctionnels)

Les marqueurs moléculaires (SSRs, SNPs...) sont la base de nombreuses études fondamentales portant sur la structure, le fonctionnement et l'évolution du génome de blé. En parallèles, ces marqueurs ont permis l'exploitation des ressources génétiques, l'identification des régions du génomes portant des gènes d'intérêt et l'amélioration des variétés moyennant la sélection assistée par les marqueurs (MAS) et aussi l'assemblage des allèles favorables (gene pyramiding). Ainsi notre laboratoire s'est fixé, comme objectif pour ce contrat programme le développement de l'axe « marqueurs moléculaires» pour la caractérisation moléculaire du « germaplasme Tunisien » du blé dur, la sélection variétale et aussi l'identification des nouveaux gènes candidats pour la tolérance aux contraintes abiotiques.

Durant cette année, notre travail a été focalisé sur la mise en place de l'utilisation des marqueurs moléculaires au niveau de notre laboratoire, commande, achat matériel-optimisation des protocoles. Une première liste de marqueurs moléculaires du type EST-SSRs et SSR, couvrant le génome de blé dur, a été établie en se basant sur les Data bases publiques et certaines publications. Des Premiers essaies ont été effectués sur une dizaine de variétés. Certains résultats préliminaires sont encourageants et nous ont incités à utiliser ces marqueurs pour la caractérisation de notre collection de blé dur.

Action3/ Evaluation de la qualité physicochimique, technologique et biochimique de certaines variétés /landraces Tunisiennes de blé dur

Cette action a été consacrée à la caractérisation physicochimique, biochimique et technologique de variétés Tunisiennes de blé dur. Le travail est effectué sur une série de 18 variétés de blé dur représentative de la culture du blé dur en Tunisie tout le long au vingtième siècle. Cette collection renferme sept landraces (Hamira, Jnah Khotifa, Richi, Beskri, Agili, Mahmoudi and Bidi), cinq anciennes variétés (Chili, Kyperounda, INRAT 69, Badri and Maghrbi) and 6 variétés modernes à haut rendement (Karim, Khiar, Om Rabia, Nasr, INRAT Maali et Salim) issues de programme d'amélioration national et international.

Au cours de ce travail différents paramètres ont été étudiés :

- 1. Les composantes de rendement : le rendement, le nombre de grains par épie et le poids de mille graines.
- 2. Les paramètres physicochimiques : Pourcentage de mitadinage, Teneur en eau, Détermination de la teneur en cendre, en protéine, en amidon total, en amylopectine et amylose.
- 3. Les paramètres technologiques : la force de gluten (Test de sédimentation), l'index de Sédimentation, Détermination de gluten humide et du gluten sec et la teneur en pigments jaunes.

Certains résultats obtenus sont promoteurs et nous ont incités à faire certaines répétitions et optimisation de certains protocoles. Une étude statistique est en cours pour évaluer nos variétés

de blé dur et comparer les landraces /anciennes variétés aux variétés couramment utilisés par les agriculteurs de point agronomique et potentialités technologiques.

<u>Projet 4:</u> Exploration et valorisation des macromolécules associées au stress chez les plantes

Les protéines végétales constituent un réservoir de macromolécules disponibles en grande quantité avec des fonctionnalités très diverses selon le type de protéines et les technologies d'exploitation. Ce potentiel reste encore trop peu exploité à cause des verrous technologiques liés à la fois à l'extraction et à l'analyse fonctionnelle de ces protéines. Dans le présent projet, un intérêt particulier a été accordé à des protéines de stress qui sont non seulement impliquées dans l'amélioration de la tolérance des plantes aux stress abiotiques, mais qui pourraient avoir aussi des implications économiques dans le domaine de la biotechnologie appliquée à l'agriculture ainsi que pour le développement de produits d'intérêt industriel.

Action 1/ Etude des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant Protein)

Les protéines LEA sont des protéines qui contribuent, principalement chez les végétaux, à l'acquisition de la tolérance à la dessiccation, en particulier dans le cas de déshydratation ou de stress induit par le froid et le sel. Nos travaux de recherche ont permis de montrer que la déhydrine (DHN-5), appartenant au groupe 2 des protéines LEA, joue un rôle dans l'amélioration de la tolérance aux stress salin et hydrique chez des plantes transgéniques d'*A. thaliana*. Afin de d'étudier le rôle de chacun des différents segments composant DHN-5, nous avons construit des protéines recombinantes de DHN-5 (YS; K1-Φ-K2) et nous avons étudié leurs rôles in vitro et in vivo. Les résultats ont montré que les segments K ont des activités antibactériennes et antifongiques contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et des champignons. En se basant sur ces résultats, nous avons proposé que les segments K puissent jouer un rôle protecteur chez les plantes dans des conditions de stress abiotique et biotiques. Ces résultats ont été confirmés in vivo chez *A. thaliana*. En effet, les plantes transgéniques surexprimant les formes DHN-5 ou YSK1 ou encore K1-Φ-K2 ont montrés des phénotypes plus résistants aux contraintes salines, osmotiques et hormonales que les plantes témoins ou celles surexprimants la forme YS.

Action 2/ Etude des protéines de transfert de lipides (LTP)

Les protéines de transfert de lipides sont des protéines de petite taille (7-9 kDa), riches en hélices et en cystéines. Cette famille de protéines est présente dans les graines oléagineuses mais aussi dans les céréales. Elles sont étroitement associées à de nombreux processus de développement et de réponse aux stress biotiques (pathogènes microbiens, blessures) et abiotiques (chocs thermiques). Nous avons identifié une nouvelle protéine de transfert de lipides de blé dur nommée TdLTP4. Afin d'étudier les rôles biologiques (activités antibactériennes et antifongiques) de cette protéine et son potentiel allergique, une expression hétérologue (sous forme de protéine recombinante) a été réalisé par expression de la protéine TdLTP4 dans deux systèmes différents : E. coli, et Pichia Pastoris suivie de tests préliminaires d'allergénicité. Nous avons montré que les deux systèmes d'expression (E. coli et Pichia pastoris) permettent la purification de la protéine TdLTP4 avec une préférence pour le système Pichia. Le potentiel allergénique de la protéine recombinante TdLTP4 a été testé par une immunodetection en utilisant le sérum d'un patient (PEI 131 : patient réactif avec toutes les protéines de Transfert de Lipides (LTP)). Nous avons utilisé comme contrôle négatif le sérum du patient (PEI 230) qui est généralement non allergique aux protéines de transfert de lipides. Les résultats de l'immunodétection ont montré que la protéine TdLTP4 du blé purifiée du système bactérien réagit avec le patient PEI 131(patient allergique), ce qui confirme que la protéine possède un potentiel allergique mais qui n'est pas assez puissant.

Action 3/ Etude des rédoxines et leur valorisation dans l'amélioration de la qualité germinative et technologique des céréales

Une meilleure compréhension de la physiologie de la semence des céréales est nécessaire pour développer de nouvelles variétés capables de répondre aux besoins économiques et écologiques de la Tunisie. Cette action s'inscrit dans l'optique d'une compréhension de la qualité germinative du blé en particulier et des céréales en générale, par le biais de marqueurs et principalement les rédoxines. Les rédoxines constituent une famille de protéines fonctionnelles, impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction. Parmi les rédoxines, les systèmes des thiorédoxines (Trxs), sont les plus étudiés pour comprendre ces mécanismes. Chez les céréales et le blé en particulier, les Trxs de type h sont présentes dans le grain, il serait intéressant de voir si leur modulation par des éliciteurs ou leur surexpression peut contribuer à l'amélioration de la qualité germinative, la viscosité de la patte, le contrôle du stress mais aussi la diminution de l'effet allergène des produits dérivés du blé. Nous avons identifié 5 formes de Trx h chez le blé dur nommées comme suivant : Trx h1, Trx h2, Trx h3, Trx h5 et Trx h9. L'alignement de séquences de ces différentes Trx h et l'arbre phyllogénétique obtenus montrent une différence des Trx h du blé dur par rapport à celles identifiées chez le blé tendre et chez Arabidopsis thaliana (plante modèle) ce qui pourrait suggérer des fonctionnalités différentes. L'expression spatio-temporelle des différentes formes de Trx h sous contraintes saline chez une paire contrastante de blé au stade germinatif par PCR quantitative en temps réels sera étudiée. Ceci nous permettra d'identifier la forme la plus sensible au stress salin.

Action 4/ Caractérisation qualitative des variétés d'orges locales (Composition phénolique et pouvoir antioxydant)

Au cours de cette action, nous avons choisit d'étudier les 4 variétés locales d'orge les plus cultivées (Manel, Souihli, Faiz et Rihane). Ainsi, le pouvoir antioxydant d'extraits méthanoliques de graines d'orge a été déterminé pour ces différentes variétés. Les paramètres choisis pour définir le potentiel antioxydant sont : ABTS, FRAP, B-Carot, DPPH et O-2. Ces paramètres indiquent que la variété Swihli possède le pouvoir antioxydant le plus important. L'activité inhibitrice de ces extraits contre des souches cliniques (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus et Salomonella*) a été étudiée. Nos résultats montrent clairement que les extraits de la variété Swihli sont les plus efficaces dans l'inhibition de ces bactéries. En plus, seulement la variété Swihli est capable de réduire la croissance de *B. subtilis* in-vitro. Les extraits des autres variétés ont montré un effet inhibiteur moins important par rapport à celui de la variété Swihli contre les bactéries suivantes : *E. coli, S. aureus, Salomonella* et *M. luteus*. Des analyses chromatographiques (HPLC et LC-MS) sont en cours à fin de déterminer les composés phénoliques chez les différentes variétés d'orges locales.

Action 5/ Application des huiles essentielles et des flavonoïdes en bio-conservation des graines de céréales

Les huiles essentielles des plantes sont très recherchées, car elles sont généralement dotées de propriétés biologiques intéressantes. Certaines ont des propriétés pharmaceutiques reconnues, d'autres sont utilisées comme bases de parfums ou comme additifs alimentaires. Cette action vise l'exploitation de l'activité phytotoxique (allélopatique) de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L pour l'inhibition de la germination des graines de blé et d'orge et l'interprétation des effet observés pour mieux comprendre la physiologie de la germination et mettre en œuvre

cette huile dans le domaine de la bio-conservation. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont très préliminaires.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La Tunisie est un grand importateur de blé dur et souffre, par conséquent, d'une forte dépendance de l'extérieur. Il devient, donc urgent, d'orienter la recherche vers la création des variétés de blé dur plus tolérante au stress abiotique. Cette création passe obligatoirement par la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes aux stress salin et hydrique. L'approche adoptée par notre laboratoire est multidisciplinaire basée sur des outils bioinformatiques, moléculaires, biochimiques et de transgènèse végétale. Nous comptons dans la suite du programme de recherche continuer notre stratégie pour l'identification des gènes candidats les plus pertinents utilisables pour la création et la valorisation de nouvelles ressources phytogénétiques en céréales. La valorisation de certaines protéines associées au stress et/ou enzymes qui peuvent servir pour des applications biotechnologiques et industrielles serait parmi les objectifs finaux du laboratoire.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications Internationales en 2015

- 1) Choura M, Rebaï.A, Masmoudi K (2015). Unraveling the WRKY transcription factors network in *Arabidopsis Thaliana* by integrative approach. Network Biology, 5(2): 55-61
- 2) N. Hadiji-Abbes, F. Trifa, M. Choura, A. Khabir, T. Sellami-Boudawara, M. Frikha, J. Daoud, R. Mokdad-Gargouri (2015). A novel BRCA2 in frame deletion in a Tunisian woman with early onset sporadic breast cancer. Pathologie Biologie 63 (2015) 185–189.
- 3) Nihed Ben Halima, Rania Ben Saad, Bassem Khemakhem, Imen Fendri, Slim Abdelkafi (2015). Oat (*Avena sativa* L.): Oil and Nutriment Compounds Valorization for Potential Use in Industrial Applications. *Journal. Oleo Science*. Review. 64, 915-932.
- 4) Rania Ben-Saad, Donaldo Meynard, Walid Ben-Romdhane, Delphine Mieulet, Jean-Luc Verdeil, Abdullah Al-Doss, Emmanuel Guiderdoni, Afif Hassairi. The promoter of the *AlSAP* gene from the halophyte grass *Aeluropus littoralis* directs a stress-inducible expression pattern in transgenic rice plants (2015). *Plant Cell Reports*. 34(10):1791-806.
- 5) 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. Journal of Applied genetics (2015) 56, (11), 15-26, DOI 10.1007/s13353-014-0228-7.
- 6) Drira M., Saibi W., Amara I., Masmoudi K., Hanin M., Brini F*. Wheat Dehydrin K-Segments Ensure Bacterial Stress Tolerance, Antiaggregation and Antimicrobial Effects. Applied Biochemistry and Biotechnology, (2015) DOI 10.1007/s12010-015-1502-9.
- 7) Saibi W., Drira M., Yakoubi I., Feki K., Brini F. Empiric, structural and in silico findings give birth to plausible explanations for the multifunctionality of the wheat dehydrin (DHN-5). Acta Physiologia Plantarum, (2015) DOI: 10.1007/s11738-015-1798-7.
- 8) Safi H., Saibi W., Alaoui MM., Hmyene A., Masmoudi K., Hanin M., Brini F^{*}. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in Arabidopsis thaliana. Plant Physiology and Biochemistry, (2015)89, 64-75.
- Saibi W., Feki K., Yacoubi I., Brini F. Bridging Between Proline Structure, Functions, Metabolism, and Involvement in Organism Physiology. Applied Biochemistry and Biotechnology (2015) DOI 10.1007/s12010-015-1713-0.
- **10**) Saibi W., Feki K., Ben Mahmoud R., Brini F. Durum wheat dehydrin (DHN-5) confers salinity tolerance to transgenic Arabidopsis plants through the regulation of proline metabolism and ROS scavenging system. Planta (2015) DOI 10.1007/s00425-015-2351-z.
- 11) Feki K, Yosra Kamoun Y, Ben Mahmoud R, Farhat-Khemakhem A, Gargouri A, Brini F*. Multiple abiotic stress tolerance of the transformants yeast cells and the transgenic Arabidopsis plants expressing a novel durum wheat catalase. Plant Physiology and Biochemistry (2015) 97, 420-431.
- 12) Safa Charfeddine, Mohammed Najib Saïdi, Mariam Charfeddine, Radhia Gargouri-Bouzid Genome-wide identification and expression profiling of the late embryogenesis abundant genes in potato with emphasis on dehydrins. Molecular Biology Reports. 2015 Jul; 42 (7):1163-74

- 13) Mariam Charfeddine, Mohamed Najib Saïdi , Safa Charfeddine, Asma Hammami, Radhia Gargouri Bouzid. Genome-wide analysis and expression profiling of the ERF transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.) Molecular Biotechnology 2015 Apr; 57(4):348-58
- 14) Donia Bouaziz, Mariam Charfeddine, Rania Jbir, Mohamed Najib Saidi, Julien Pirrello, Safa Charfeddine, Mondher Bouzayen, Radhia Gargouri-Bouzid. Identification and functional characterization of ten AP2/ERF genes in potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) October 2015, Volume 123, Issue 1, pp 155-172
- **15**) <u>Ebel C</u>, Hanin M (2015) Maintenance of meristem activity under stress: is there an interplay of RSS1-like proteins with the RBR pathway? <u>Plant Biol (Stuttg)</u>. DOI: 10.1111/plb.12424.
- **16**) Mahjoubi H, Ebel C, Hanin M (2015) Molecular and functional characterization of the durum wheat TdRL1, a member of the conserved Poaceae RSS1-like family that exhibits features of intrinsically disordered proteins and confers stress tolerance in yeast. Funct Integr Genomics 15, 717-728.
- 17) Ghorbel M, Zaidi I, Robe E, Ranty B, Mazars C, Galaud JP, Hanin M. (2015) The activity of the wheat MAP kinase phosphatase 1 is regulated by manganese and by calmodulin. Biochimie. 2015 Jan;108:13-19.
- **18**) Gouiaa, S., Khoudi, H. 2015. Co-expression of vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter and H⁺-pyrophosphatase with an IRES-mediated dicistronic vector improves salinity tolerance and enhances potassium biofortification of tomato. Phytochemistry 117:537-46
- **19**) Djemal, R., Khoudi, H. 2015. Isolation and molecular characterization of a novel WIN1/SHN1 ethyleneresponsive transcription factor TdSHN1 from durum wheat (*Triticum turgidum*. L. subsp. durum). Protoplasma 252:1461-1473
- **20**) Walid Saibi "Cellulases: Suppliers of energy and basic compounds, so life "International Journal of Engineering & Science (2015).
- 21) Walid Saibi, Nabil Zouari, Khaled Masmoudi, Faiçal Brini "Role of the durum wheat dehydrin in the function of proteases conferring salinity tolerance in Arabidopsis thaliana transgenic lines"
- **22**) Fatma Boukid, Zayneb Boukid, Mondher Mejri (2015) "Opuntia Cladodes: Physicochemical parameters, Functional Properties and Application in Formulation of Rolled Cake of Cladode Flour Fabric (Part 2)" Inter J Adv Sci Eng. 1(4): 30-34.
- 23) Fatma Boukid, Zayneb Boukid, Mondher Mejri (2015) "Opuntia Cladodes: Drying Process and Water Vapor Sorption Properties (Part 1) ". Inter J Adv Sci Eng. 1(4): 23-29.
- **24**) Feki K, Saibi W, Brini F*. (2015) Understanding Plant Stress Response and Tolerance to Salinity from Gene to Whole Plant. Book entitled ''Managing salt tolerance in plants: molecular and genomic perspectives'' edited by Mohammed Anwar Hussain and Shabir Wani. Chapter one, pp 1-17.

Thèses Soutenues en 2015 (Nombre total: 1):

- **Mouna Ghorbel :** Régulation de TMKP1, une MAPkinase phosphatase de blé par les calmodulines et les protéines 14.3.3 et leurs rôles dans la réponse des plantes aux stresses environnementaux (soutenue le 11 Juin 2015 à la FSS).

Mastères Soutenus en 2015 (Nombre total : 2) :

- **Bochra Zaidi :** Isolement du promoteur de gène *AlMYB* par la technique « Chromosome Walking » et étude de son expression chez le tabac (soutenu le 23 Novembre 2015 à la FSG).
- Dhawya Mergbi: Identification et caractérisation des facteurs de transcriptions de type NAC impliqués dans la réponse au stress abiotique chez le blé dur (soutenu le 19 Novembre 2015 à la FSS).

Missions Effectuées Dans le Cadre de Projets de Collaboration (2015)

- **-Chantal Ebel** (15 au 21 Avril 2015) : Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Strasbourg-France.
- -Habib Khoudi (23 au 26 Aout 2015): Centre National de Recherche (NRC), Caire-Egypte.
- **-Mouna Choura** (19 au 31 Octobre 2015) : Laboratoire de Dynamique des Structures et des Interactions ses Macromolécules Biologiques, Paris-France
- -Inès Yakoubi (08 au 16 Juin 2015): Crop Molecular Breeding Laboratory, Korea University

Stages Effectuées A l'Etranger (2015)

- **-Héla Safi** (03 Septembre- 21 Novembre 2015): Paul-Ehrlich Institut for Vaccines and Biomedicines, Langen-Germany
- -Nebrass Belgaroui : (05 Mai au 13 Juillet 2015) : Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes- INRA-Supagro Montpellier, France.
- **-Karama Hamdi** (07 Septembre au 07 Novembre 2015) : Laboratoire d'Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Marseille-France
- **-Fatma Boukid** (15 Octobre au 15 Décembre 2015) : Département des Sciences Alimentaires, Université de Parme-Italie
- -Sahar Sellami (01 Mai- 30 Octobre 2015) : Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Institut National de Recherche Agronomique, Centre de Versailles-Grignon (INRA)-France.
- **-Habib Mahjoubi** (15 Avril au 15 Juin 2015) : Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Strasbourg- France.
- -Mariem Bradaii (06 Novembre à 25 Décembre 2015) : Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS, Strasbourg-France.
- Sana Tounsi (05 Mai à 05 Aout 2015) : Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes, Supagro Montpellier, France.
- Rania Jmal (15 Avril au 01 Juillet 2015) : Laboratoire de Génomique et Biotechnologie de Fruit, Toulouse-France.
- -Asma Feki: (01 au 30 Octobre 2015): Institut de Biologie Moléculaire, CSIC Madrid Espagne

LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB)

مخبر الأحياء الدقيقة والجزيئات الفعالة

Responsable : Pr. Lotfi MELLOULI

Email: lotfi.mallouli@cbs.rnrt.tn

I.LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Chercheurs permanents

Corps A: Corps B

Pr. Lotfi MELLOULI (CBS) Dr. Ali FENDRI (M.A. CBS)

Pr. Hichem CHOUAYEKH (CBS)

Dr. Sondes KARRAY-CHOUAYEKH (M.A. ISEP)

Pr. Radhouane KAMMOUN (ISBS) Dr. Slim SMAOUI (Ass. CBS)

Dr. Riadh BEN SALAH (M.C. CBS)

Docteurs Cadres techniques permanents

Dr. Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA Ines KARRAY-REBAI (Ing. En Chef)

Dr. Mouna KRIAA Monia BLIBECH-HAMMAMI (Ing. Princ.)

Dr. Imen TRABELSI-KANOUN Maher HMIDI (Tech. Princ)

Dr. Ines BOUKHRIS- CHOUAYEKH Kameleddine BOUCHAALA (Ass.App.Rech.Princ.)

Dr. Ameny FARHAT-KHEMAKHEM

Doctorants

Soumaya NAJAH
 Imen SELLEM
 Fatma KAANICHE

Sana MOUELHI - Sirine BEN SLIMA - Nadia BAYAR

- Marwa BEN RHOUMA - Yosri BEN NASR

Mastères en cours:

02 de Recherche + 02 professionnels

II. OBJECTIFS GENERAUX

De plus en plus, l'homme accorde de l'importance à sa santé et ces dernières décennies, il a mis en évidence une relation très étroite entre l'alimentation saine et le bien être. Cependant, avec l'explosion démographique et l'accélération du rythme de la vie, l'homme s'est trouvé contraint à deux problèmes: Le premier consiste à multiplier énormément sa production alimentaire et à valoriser les agroressources pour subvenir aux besoins des populations, le deuxième est de trouver les techniques et les additifs nécessaires pour garder la fraicheur et les qualités microbiologiques, texturales et organoleptiques des aliments. Pour surmonter ces deux contraintes, l'homme a utilisé et continu à utiliser des produits chimiques contre les phytopathogènes dans le domaine agricole, et des additifs chimiques de synthèses dans l'alimentation animale et l'industrie agro-alimentaire. Ces produits de synthèse chimique engendrent des conséquences très néfastes sur la faune, la flore, l'environnement et la santé humaine. Devant cette situation, plusieurs travaux de recherche, à échelles internationale et nationale, sont actuellement orientés vers d'une part, le remplacement des produits et additifs chimiques par des substances naturelles dans les domaines de l'agriculture (agriculture biologique), de l'alimentation animale et dans l'industrie agro-alimentaire et d'autre part, vers la valorisation des coproduits issus de l'agriculture et de l'agro-industrie comme alternatives aux matières premières dont le coût ne cesse d'augmenter.

Le contrat programme, 2015-2018, du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB), entre dans ce cadre de recherche qui consiste globalement, d'une part à remplacer les produits et

additifs chimiques par des substances naturelles dans les domaines de l'agriculture, de l'alimentation animale et dans l'industrie agro-alimentaire et d'autre part, à valoriser des coproduits issus de l'agriculture et de l'agro-industrie. Ces substances naturelles et ces agents de transformations seront recherchés à partir de microorganismes et de plantes.

Avec ce contrat programme, nous visons plusieurs objectifs. Des objectifs ayant un aspect appliqué orienté vers la notion recherche-développement, et d'autres objectifs qui entrent dans le cadre de la formation d'étudiants et la compréhension détaillée de quelques phénomènes scientifiques.

III. OBJECTIFS SPECIFIQUES

- 1. Production de biomolécules pures et d'extraits bioactifs naturels pour des utilisations pharmaceutiques et en agriculture biologique.
- 2. Remplacement des additifs et conservateurs chimiques utilisés dans le domaine agroalimentaire, qui sont dangereux pour la santé humaine, par des biomolécules naturelles et des biofilms microbiens probiotiques.
- **3.** Caractérisation d'enzymes et de bactéries probiotiques vecteurs d'activités enzymatiques et leur valorisation par le développement d'applications en nutrition/santé animale comme alternatives aux promoteurs de croissance antimicrobiens prohibés
- **4.** Valorisation de quelques agroressources et la production des additifs naturels, en milieu semi solide, pour utilisation en alimentation animale et comme biofertilisants.
- **5.** Détection, analyse et compréhension des phénomènes de l'expression génique de quelques voies de biosynthèses de métabolites primaires (ex. les phytases) et secondaires (ex. les voies de biosynthèses des rhamnopyranosides) pour la surexpression des activités et constructions de biomolécules hybrides
 - 6. Formation d'étudiants en Thèses, Mastères et Projets de fin d'Etudes.
- **7.** Publications d'articles dans des journaux à comité de lecture internationale (à impact facteur)
 - 8. Génération de brevets nationaux, éventuellement internationaux
 - **9.** Conventions/Contrats avec des industriels
 - 10. Mise en place de projets de coopération scientifique bilatéraux et multilatéraux

Pour la réalisation de ces objectifs, quatre projets sont proposés dans le cadre du contrat programme LMB-CBS-2015-2018. Ci-après sont donnés les principaux résultats de recherche obtenus par projet au cours de l'année 2015.

IV. INTITULE DES PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS

IV. 1. Projet 1. (Responsable Pr. Lotfi MELLOULI).

Titre «Biomolécules pour des applications industrielles et agricoles».

Personnel impliqué: Pr. Lotfi MELLOULI; Dr. Slim SMAOUI; Dr. Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA Mme Ines KARRAY-REBAI (Ing en. en chef); Mr. Maher HMIDI (Technicien principal); Mr. Kameleddine BOUCHAALA (Assistant d'application de recherche principal); Doctorants: Mme Soumaya NAJAH-BEN YOUSSEF; Imen SELLEM et Fatma KAANICHE.

* Situation du projet: Ce présent projet de recherche vise deux objectifs globaux : Le premier objectif, qui constituera l'axe principal de recherche de ce projet, consiste à découvrir des nouvelles biomolécules naturelles notamment à partir de microorganismes et de plantes pour des

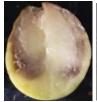
utilisations en agriculture (lutte biologique) et dans l'industrie (agro-alimentaires-pharmaceutiques). Le deuxième objectif, qui pourrait avoir à moyen et à long termes un impact appliqué par la génération de nouvelles biomolécules hybrides par génie génétique, consiste à détecter et analyser tous les clusters de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des biomolécules de la famille des rhamnopyranosides déjà purifiées et caractérisées dans des travaux antérieurs.

* Rappel des résultats antérieurs:

- Isolement d'environ 1000 souches actinomycètes, genre *Streptomyces*, à partir de différents habitats Tunisiens. Sélection des isolats pour leurs capacités de produire des molécules bioactives.
- Identification d'une vingtaine de souches sélectionnées. Purification et caractérisation chimique des biomolécules de neuf souches (Environ cent biomolécules pures ayant des activités antibactériennes et /ou antifongiques et/ou antitumorales ont été identifiées chimiquement).
- Essais de quelques biomolécules pures contre quelques formes cancéreuses
- Confirmation des résultats positifs in *vitro* de quelques extraits bioactifs contre des phytopathogènes qui attaquent l'olivier, la tomate et la pomme de terre par des tests in *vivo* (sous serres et en champ)
- Isolement d'environ 300 bactéries lactiques qui ont été testées pour leur capacité de produire des bactériocines. Sélection d'une dizaine d'isolats dont trois ont été identifiées (TN635, FL31 et J1).
- Purification, caractérisation biochimique et détermination de la séquence NH2_T de BacTN635, BacFL31 et BacJ1 et leurs tests dans la conservation des dérivés de viandes.
- Etudes des activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticholinestérases des huiles essentielles et des extraits bioactifs des trois compartiments (tige-feuilles-fleurs) de quatre plantes endémiques.
- Séquence complète du génome d'une souche de *Streptomyces* (TN58) qui secrète naturellement des molécules rhamnopyranosides ayant des activités anticancéreuses.

* Travaux réalisés en 2015.

- Purification et caractérisation chimique de six biomolécules produites par une nouvelle *Streptomyces*. Tests de ces biomolécules pures contre des lignées cancéreuses (en cours). Utilisation de l'extrait bioactifs de cette souche (S1) contre le phytopathogène *Pythium ultimum* agent causal de la pourriture de la pomme de terre. Confirmation des résultats in *vitro* par des tests in *vivo* (**Fig. 1**).





A: Tubercule infectée par P. ultimum non traité

B: Tubercule infectée par *P.ultimum* et traitée par l'extrait bioactif de S1

A B

- Production à échelle pilote d'extrait bioactif d'une souche de *Streptomyces* (S2) ayant forte activité inhibitrice contre les phytopathogènes et tests en champ pour traiter des oliviers contaminés par le *Verticillium dahliae* (verticilliose). Confirmation des résultats in *vitro* par les tests in *vivo* (**Fig. 2**)





A: Infectée par V.hdahliae et non traitée

B: Infectée par V.hdahliaeet traitée par l'extrait bioactif de S2

A B

- Applications des bactériocines étudiées et caractérisées au LMB, à l'état semi purifié pour la conservation à 4°C des dérivés de viandes en remplacement des additifs chimiques nocifs. L'addition de ces bactériocines (testées une à une) a amélioré: la qualité microbiologique, la stabilité physicochimique, les attributs sensoriels et le profil textural des dérivés de viande (bœufs et volailles). De plus, l'ajout de ces bactériocines permet de prolonger la durée de conservation d'environ sept jours. La combinaison bactériocines (BacTN635 ou BacFL31 ou BacJ1) + huile essentielle (deux huiles essentielles testées et préparées à partir de plantes étudiées au laboratoire) améliore davantage les qualités des viandes et leur durée de conservation à 4°C.
- Voies de biosynthèses des molécules rhamnopyranosides de la souche TN58 (ayant des activités anticancéreuses) :
- * L'analyse de la séquence génomique totale par des alignements et des prédictions de fonctions, a permis de localiser quelques clusters.
- * Par des études de distruptions de gènes et de complémentations génétiques, les gènes des voies de biosynthèses de ces biomolécules sont éparpillés sur le chromosome et non rassemblées en clusters ? Une situation originale.
 - * Détection d'une troisième molécule rhamnopyranosides en DEDL

IV. 2. Projet 2. (Responsable Pr. Hichem CHOUAYEKH)

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

Personnel impliqué: Pr. Hichem CHOUAYEKH; Dr. Riadh BEN SALAH (M.C); Dr. Ali FENDRI; Dr. Ameny FARHAT-KHEMAKHEM; Dr. Ines BOUKHRIS; Mme Monia BLIBECH-HAMMAMI (Ingénieur principal) et Sana MOUELHI (doctorante)

I. Les enzymes phytases

Les phytases hydrolysent les phytates: forme majeure de stockage du P dans les céréales et considérés comme facteurs anti-nutritionnels qui chélatent les cations comme Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺... réduisant leur biodisponibilité. La faible digestibilité du P-phytique chez les animaux monogastriques (volailles, poissons et porcs) nécessite la supplémentation de leurs aliments avec du phosphate inorganique (Pi). Ceci engendre un coût supplémentaire, ne diminue pas les effets anti-nutritionnels des phytates et augmente la pollution de l'environnement par l'excrétion de fientes très chargées en P.

I.1. Effets de la supplémentation de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* US573 comme probiotique pour les poulets de chair: Dans le cadre d'un contrat de recherche collaborative avec la société ADISSEO, l'enzyme «PHY US573» de la souche *B. amyloliquefaciens* US573 a été purifiée (42 kDa) et caractérisée. L'ensemble des propriétés de PHY US573 font de cette phytase une candidate intéressante pour une application comme additif dans les aliments pour volailles. Par ailleurs, PHY US573 s'est révélée remarquablement tolérante aux sels puisqu'elle conserve 80 et 95% de son activité en présence de 20 g/l de NaCl et LiCl, respectivement (Fig. 3). De ce fait, cette phytase pourrait être très

intéressante pour améliorer la bio-disponibilité du P- phytique pour les plantes cultivées dans des sols à forte salinité et teneur en phytates.

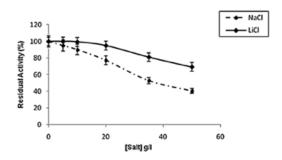


Figure 3. Effets des sels sur l'activité de la phytase PHY US573.

Suite à la caractérisation *in vitro* des propriétés probiotiques de la souche *B. amyloliquefaciens* US573 productrice de phytase (résistance aux conditions du tractus gastro-intestinal, sensibilité aux antibiotiques, capacité d'adhésion aux entérocytes de poulet...) ainsi que les autres enzymes hydrolytiques qu'elle produit (xylanase, β-glucanase et amylase), nous avons investigué les effets de la supplémentation de cette bactérie comme probiotique (à raison de 5.10⁸ CFU/kg d'aliment en l'absence d'agents coccidiostatiques, d'enzymes et d'antibiotiques promoteurs de croissance) sur les performances des poulets de chair. 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. 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.

I.2. Etude de la régulation de l'expression de gènes phytase de *Streptomyces*. Dans le cadre du projet CMCU n° 11G 0924 (CHOUAYEKH/VIROLLE) nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation de l'expression du gène phytase de *S. coelicolor* M145 (*sco7697*) chez *S. coelicolor* M145, *S. lividans* TK24 ainsi que chez ses deux mutants *ppk* et *phoP*. Pour ce faire, nous avons fusionné les régions promotrices sauvage (*phyWT*) ou mutées (*phym1*: délétion de la boîte PHO localisée en amont de la séquence promotrice -35, *phym2*: altération de la séquence répétée directe «RD» localisée en aval de la séquence promotrice -10, *phym1*+2: délétion de la boîte PHO en amont du -35 et altération de la RD en aval du -10) du gène *sco7697* avec le gène rapporteur GUS codant la β-glucuronidase. Ainsi, nous avons démontré que la délétion de la boîte PHO localisée en amont du -35 entraîne une réduction du niveau d'induction de *sco7697* en conditions de limitation en Pi. Par ailleurs, nous avons révélé pour la première fois que l'altération de la RD localisée en aval du -10 est corrélée avec une augmentation drastique de l'expression de GUS lorsque PhoP est présent. Nos résultats démontrent que cette RD est le siège d'une forte régulation négative par un répresseur inconnu. Ce dernier empêcherait l'activation PhoP-dépendante de l'expression du gène phytase.

II. Les enzymes mannanases

Les β -mannanases catalysent l'hydrolyse des liaisons β -1,4-mannosidiques dans la chaîne principale des mannanes, gluco et galactomannanes. Elles génèrent des manno-oligosaccharides et une petite quantité de mannose, glucose et galactose. Les mannanes sont considérés comme facteurs antinutritionnels puisqu'ils combinent souvent avec 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, la β -mannanase est ajoutée pour digérer les mannanes, améliorer le taux de conversion de l'aliment, les performances de croissance ainsi que la

santé animale. Suite à un criblage, nous avons sélectionné 5 souches nommées US134, US150, US176, US180 et US191 produisant une activité mannanase extracellulaire. L'optimisation des conditions de production, la caractérisation biochimique et le clonage de ces mannanses est en cours. Par ailleurs, nous avons évalué le potentiel de ces 5 souches pour application comme "direct-fed microbials" dans l'industrie de la volaille en se basant sur un criblage *in vitro* pour des propriétés probiotiques, le profil fermentaire, la digestibilité de la matière sèche du blé, et la capacité de produire d'autres enzymes hydrolytiques (xylanase, amylase et β-glucanase). Ceci a permis de sélectionner la souche *Bacillus subtilis* US191, ne possédant des enzymes indésirables, sensible aux 23 antibiotiques testés; présentant des effets antagonistes prononcés contre plusieurs pathogènes aviaires, ayant une bonne tolérance au pH acide et aux sels biliaires, une bonne performance dans la digestibilité *in vitro* du blé et productrice d'activité amylase, protéase, xylanase et β-glucanase.

IV. 3. Projet 3. (Responsable Dr. Riadh BEN SALAH).

Titre «Production et Formulation de biofilms bactériens en agroalimentaire»

Personnel impliqué: Dr. Riadh BEN SALAH (M.C); Pr. Hichem CHOUAYEKH; Pr. Radhouane KAMMOUN; Dr. Sondes KARRAY-CHOUAYEKH; Dr. Imen TRABELSI-KANOUN; Mr. Kameleddine BOUCHAALA; Sirine BEN SLIMA-KOLSI (doctorante)

La production d'un aliment fonctionnel contenant des composés biologiquement actifs définit de nos jours l'intérêt des consommateurs. Le nitrite est un additif chimique utilisé à des concentrations élevées dans les produits de charcuteries entrainant des effets très nocifs sur la santé des consommateurs. Ainsi, l'objectif est de substituer le nitrite par la souche, *Lactobacillus plantarum* TN8, dans la saucisse fraiche tout en étudiant les effets sur les propriétés physico-chimiques, texturales et microbiologiques de ce produit pendant le stockage à 4°C durant 10 jours.

Les résultats obtenus ont montré que l'incorporation de la souche probiotique améliore la qualité microbiologique en réduisant la croissance de *Salmonella enterica* (**Fig. 4**) et *Listeria monocytogenes* dans les saucisses fraiches durant leur stockage à 4°C pendant 10 j (**Fig. 5**).

Figure 4. Evolution de la souche *Salmonella enterica* dans les saucisses fraiches inoculées ou non par la souche probiotique. A1 : Témoin (10⁵ UFC/g de *Salmonella enterica* sans addition de la souche probiotique) ; B1 : Saucisse additionnée de: 10⁵ UFC / g de *Salmonella enterica* +10⁷ UFC/g de la souche probiotique ; C1 Saucisse additionnée de 10⁵ UFC / g de *Salmonella enterica* +10⁸ UFC/g de la souche probiotique.

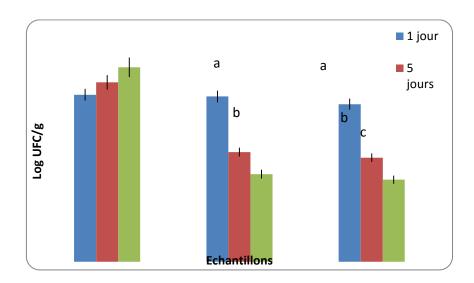


Figure 5. Evolution de la souche *Listeria monocytogenes* dans les saucisses fraîches inoculées ou non par la souche probiotique. A1 : Témoin (10⁵ UFC / g de *Listeria monocytogenes* sans addition de la souche probiotique) ; B1 : Saucisse additionnée : 10⁵ UFC / g de *Listeria monocytogenes* +10⁷ UFC/g de la souche probiotique ; C1 : Saucisse additionnée : 10⁵ UFC / g de *Listeria monocytogenes* +10⁸ UFC/g de la souche probiotique.

La substitution du nitrite par la souche probiotique n'a aucun effet sur les valeurs de TBARS qui, dans tous les échantillons des saucisses, sont inférieures à la valeur limite d'acceptabilité de l'oxydation lipidique qui est de l'ordre 2 mg MDA/Kg. La substitution du nitrite par la souche probiotique améliore les propriétés texturales des saucisses formulées avec la souche probiotique en diminuant l'élasticité, la masticabilité et la dureté. L'analyse physico-chimique a montré que la valeur du pH diminue dans les saucisses inoculées par la souche probiotique due à l'acidification du produit par la production d'acide lactique. D'autre part, l'analyse de la couleur des saucisses formulées avec la souche probiotique a indiqué que la substitution du nitrite entraine une diminution du rapport a*/b* sans affecter la luminosité.

IV. 4. Projet 4. (Responsable Pr. Radhouane KAMMOUN).

Titre «Valorisation des Agroressources par la voie microbienne»

Personnel impliqué: Pr. Radhouane KAMMOUN; Pr. Hichem CHOUAYEKH; Dr. Mouna KRIAA; Mr. Maher HMIDI (Technicien principal); Doctorants: Nadia BAYAR; Marwa BEN RHOUMA-ABBES; Yosri BEN NASR.

Durant l'année 2015, nous avons d'une part, poursuivi les travaux de recherche déjà développés depuis quelques années et d'autre part, nous avons initié des nouvelles recherches se rapportant à ce quatrième projet.

* Suite des travaux antérieurs

- Nous avons testé la glucose oxydase (GOD) d'Aspergillus tubingensis CTM 507 semi purifiée en panification et en agriculture. L'influence des proportions de trois composés (alpha amylase, acide ascorbique et glucose oxydase) sur les propriétés rhéologiques et texturales de la pâte ainsi que sur les caractéristiques texturales du pain a été entrepris. Les modèles générés ont permis de prédire le comportement de la farine de blé et de définir la formule qui conduit à des qualités rhéologiques et de cuisson de pâte désirées.
- Parallèlement, nous avons testé *in vitro* et *in vivo* l'activité antifongique de GOD partiellement purifiée pour lutter contre plusieurs champignons phytopathogènes. Les résultats obtenus ont montré que la GOD a un effet fongicide contre *Fusarium solani* et *Pythium ultimum*. L'activité

antifongique de la GOD a été aussi prouvée *in vivo* pour lutter contre la pourriture rose atypique des tubercules de pomme de terre causée par *P. ultimum*. D'autres essais *in vivo* effectués sur des jeunes plantules de tomate ont montré la capacité de la GOD à supprimer l'infection fongique causée par *F. solani*.

- L'étude de l'évolution des 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, en collaboration avec la société LE BON GOUT, montre que l'amidon acétylé hydrolysé a un pourcentage de groupes acétyles et un degré de substitution plus élevé que l'amidon acétylé et une teneur plus faible en sucres réducteurs que l'amidon hydrolysé. A une concentration de 5% dans le cake on assiste à une réduction de la dureté, la cohésion, l'adhésion et la masticabilité en plus de l'amélioration de l'élasticité, du volume, de la hauteur, la couleur de la croûte et l'aspect du cake cuit.

* Valorisation des agro ressources par voie Microbienne

- Extraction, caractérisation et fonctionnalité technologique de trois polysaccharides de raquette d'Opuntia Ficus Indica. L'extraction et la caractérisation de trois polysaccharides issus de mucilage (MC), de la pectine (PC) et de la fraction totale de mucilage pectique (TFC) à partir de raquette d'Opuntia ficus indica ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydantes ont été étudiées. MC a été extrait avec un rapport liquide / solide de 1 g / 10 ml, à 25 ° C et à 150 rpm pendant 90 min. PC et TFC ont aussi été extraits avec un rapport liquide / solide de 1 g / 15 ml, pH 2,8 à 90 ° C pendant 2 h. L'analyse spectroscopique FTIR a révélée la présence de groupes carboxyle et hydroxyle correspondant à des polysaccharides. L'acide uronique et les teneurs en sucres totaux du PC étaient plus élevés que ceux de TFC et MC alors que le contenu des cendres de MC était beaucoup plus important. En outre, les résultats ont montré que tous les échantillons avaient une faible teneur en protéines et un faible poids moléculaire moyen par rapport aux résultats mentionnés dans la littérature. En outre, MC présente non seulement les plus hautes capacités de rétention de l'eau (WHC) et de l'huile (OHC) (7,81 et 1,34 g/g, respectivement) mais aussi les propriétés antioxydantes les plus élevées. Cependant, PC avait les plus fortes propriétés émulsifiantes et moussantes. Alors que TFC avait de faibles propriétés WHC, OHC et émulsifiantes et des propriétés moussantes et antioxydantes supérieures à celles MC et PC respectivement.
- Etude de la valorisation des agro ressources par fermentation en milieu semi solide afin de produire des biofertilisants. L'utilisation des produits de la fermentation tels que les enzymes et les phytohormones comme biofertilisants, peut être une alternative aux produits chimiques synthétiques. De ce fait, parmi 59 souches nouvellement isolées, nous avons choisi trois souches B7 (Aspergillus), B32 (Trichoderma) et B 40 (Trichoderma) comme étant les souches les plus performantes pour la production de pectinase, CMCase, xylanase et α-amylase. On a aussi étudié la production de l'acide gibbérellique en milieu liquide par 12 souches nouvellement criblées. Une meilleure production a été obtenue par les souches B29, B25 et B35 (Fusarium). Elle est de l'ordre de 371, 329 et 281mg/ml, respectivement.
- Production économique d'un complexe enzymatique par fermentation en milieu solide d'agro ressources et leurs applications comme additif en nutrition animale. 32 souches ont été criblé à partir de biotopes naturels, en utilisant des milieux sélectifs (tel que milieu czapek pour *Aspergillus*) pour la révélation sur boite des activités xylanases, α-amylase, phytase, xylosidase et galactosidase. Les travaux sont en cours.

V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- * Aspect appliqué. Des biomolécules pures et semi-purifiées, des extraits bioactifs et des additifs naturels, des enzymes, des probiotiques, des biofilms bactériens, des microorganismes, etc, ont été développés et/ou testés dans les domaines agricole (lutte biologique), agro-alimentaire, nutrition animale et pharmaceutique. Comme nous l'avons détaillé projet par projet, quelques résultats sont très intéressants et peuvent être optimisés davantage pour des applications à grande échelle.
- * Aspect fondamental. Durant l'année 2015, d'une part nous avons étudié la régulation de l'expression du gène phytase de *S. coelicolor* M145 (*sco7697*) chez *S. coelicolor* M145, *S. lividans* TK24 ainsi que chez ses deux mutants *ppk* et *phoP*, et d'autre part, nous avons poursuivi la détection et l'analyse des clusters de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des molécules rhamnopyranosides de la souche de *Streptomyces* TN58.

En Perspectives.

- Valoriser les acquis de recherche ayant un aspect appliqué et ceci nécessitera l'implication des Centres Techniques et le tissu industriel.
- Poursuivre les travaux ayant un aspect fondamental à court terme mais qui peuvent générer des retombées appliquées à moyen et à long termes, concernant la détection, l'analyse et la compréhension de l'expression génique de quelques gènes de métabolites primaires et secondaires.

VI. PRODUCTION SCIENTIFIQUE

VI.1. Publications

- 1) Imen TRABELSI, Sirine BEN SLIMA, Hela CHAABANE, et Riadh BEN SALAH. (2015) Purification and characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*.74: 541-546.
- 2) Naourez Ktari, OlfaBelguith-Hadriche, Ibtissem Ben Amara, Aïda Ben Hadj, MounaTurki, FatmaMakni-Ayedi, TahiaBoudaouara, Abdelfattah El Feki, Ahmed Boualga, Riadh BEN SALAH and Moncef Nasri (2015) Cholesterol regulatory effects and antioxidant activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salariabasilisca*) in cholesterol-fed rats. *Food and Function*. 6: 2273-2282
- 3) 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
- 4) Sahnoun M., Kriaa M., Elgharbi F., Zouari Ayadi D., Bejar S., & Kammoun R. (2015) *Aspergillus oryzae S2* alpha-amylase production under Solid State Fermentation: Optimization of culture conditions. *International Journal of Biological Macromolecules* http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.026
- 5) Kriaa M, Ayadi-Zouari D, Sahnoun M, Jemli S, Bejar S et Kammoun R (2015) Improved stability and reusability of cotton immobilized recombinant *Escherichia coli* producing US132 Cyclodextrin Glucanotransferase. *Annals of Microbiology*. 65:383-391.
- 6) Mouna Kriaa, Rabeb Ouhibi, Héla Graba, Souhail Besbes, Mohamed Jardak & Radhouane Kammoun (2015), 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. J Food Sci Technol DOI 10.1007/s13197-015-2092-9
- 7) Mouna Kriaa, Ine`s Hammami, Mouna Sahnoun, Manel Cheffi Azebou, Mohamed Ali Triki, Radhouane Kammoun (2015) Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a novel Aspergillus tubingensis glucose oxidase steady on broad range of pH and temperatures. Bioprocess Biosyst Eng 38: 2155–2166 DOI 10.1007/s00449-015-1455-y
- 8) Inés Hammami, Slim Smaoui, Anis Ben Hsouna, Naceur Hamdi, Mohamed Ali Triki (2015). *Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: Characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *EXCLI Journal*; 14:83-94
- 9) Boukhris I, Farhat-Khemakhem A, Blibech M, Bouchaala K, Chouayekh H. (2015) <u>Characterization of an extremely salt-tolerant and thermostable phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* US573. *Int J Biol Macromol*. pii: S0141-8130(15)00475-4. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.014.</u>
- **10**) Ben Farhat M., Boukhris I., Chouayekh H. (**2015**) Mineral phosphate solubilization by *Streptomyces* sp. CTM396 involves the excretion of gluconic acid and is stimulated by humic acids. *FEMS Microbiology Letters* 362(5) pii: fnv008. doi: 10.1093/femsle/fnv008.

11) Naourez Ktari, Imen Trabelsi, Rabab Ben Slama, Riadh BEN SALAH, Moncef Nasri and Nabil Souissi (2015). Effects of Cooking Methods on Physicochemical and Microbiological Characteristics of Zebra Blenny (Salariabasilisca) Fillets Adv Tech Biol Med, 3:136-143.

VI.2. Brevet National

Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA, Slim SMAOUI, Imen SELLEM, Soumaya NAJAH-BEN YOUSSEF, Ines KARRAY-REBAI, et Lotfi MELLOULI* (2015). La bactériocine BacFL31, produite par la nouvelle souche *Enterococcus faecium* sp. FL31, est un conservateur naturel très efficace qui améliore la qualité microbienne, la stabilité physico chimique, les attributs sensoriels et le profil textural de l'escalope de dinde hachée crue durant le stockage à 4°C. *INNORPI TUNISIE. TN2015/0204*.

VI.3. Thèses

- 1. Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA (Thèse de doctorat en Sciences Biologiques de la FSS soutenue le 09 / 09 / 2015). Titre: Purification, caractérisation et application en agro-alimentaire de deux nouvelles bactériocines de bactéries lactiques (Directeur de la thèse Pr. Lotfi MELLOULI).
- 2. Mouna KRIAA (Thèse de doctorat en Génie Biologique de l'ENIS soutenue le 18 / 11 / 2015). Titre: La glucose oxydase d'*Aspergillus tubingensis* CTM507 : optimisation de la production, purification et application dans les domaines alimentaires et biotechnologiques (Directeur de la thèse **Pr. Radhouane KAMMOUN**)
- 3. Imen TRABELSI-KANOUN (Thèse de doctorat en Sciences Biologiques de la FSS soutenue le 18 / 12 / 2015). Titre: étude des propriétés probiotiques et de production d'exopolysaccahrides de souches de *Lactobacillus*: Application comme additifs en alimentation animale (Directeur de la thèse Dr. Riadh BEN SALAH)
- **4. BOUKHRIS- CHOUAYEKH Ines** (Thèse de doctorat en Sciences Biologiques de la FSS soutenue le **21 / 12 / 2015**). **Titre:** Caractérisation, Clonage, Expression et Etude de la régulation de gènes phytases de *Streptomyces* et *Bacillus*. (Directeur de la thèse **Pr. Hichem CHOUAYEKH**)

VI.4. Mastère

Leila SOUA (Mastère de Recherche de la FSS soutenue le **07 / 11 / 2015**). **Titre** : Valorisation d'une plante médicinale issue de la flore Tunisienne «*Pituranthos scoparius*» : Caractérisation phyto-chimique, évaluation des activités biologiques et étude de son potentiel conservateur sur la viande hachée de bœuf (Encadrement **Dr. SMAOUI Slim**)

VI.5. Projets soumis en 2015

- Un projet PNRI
- Un projet VRR
- Deux projets Tuniso-Indien

VII. Missions et Stages

- Mission Pr. Hichem CHOUAYEKH du 31/05/2015 au 06/06/2015 : Promotion d'un Ecosystème d'Innovation et d'Entrepreneuriat. Faro-Portugal
- Mission Dr. Riadh BEN SALAH du 23/11/2015 au 29/11/2015 au Laboratoire des Sciences des Aliments et de la Nutrition Madrid-Espagne
- Stage de 15 jours, Dr. Slim SMAOUI, dans le cadre de l'IFT du 20/10/2015 au 04/11/2015 au Laboratoire de Génie Chimique INP-Toulouse-France

LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE)

مخبر بيوتكنولوجيا الأحياء الدقيقة و هندسة الأنزيمات

Responsable: Pr. Samir BEJAR

Email: samir.bejar@cbs.rnrt.tn

A- LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Prénom et Nom	Grade	Institution
Samir BEJAR	Professeur	CBS
Adel SAYARI	Professeur	ENIS
Mamdouh BEN ALI	Maître de Conférences	CBS
Bassem JAOUADI	Maître de Conférences	CBS
Aïda HMIDA-SAYARI	Maître Assistante	CBS
Nadia ZARAI-JAOUADI	Maître Assistante	CBS
Sameh BEN MABROUK	Maître Assistante	FSGafsa
Sonia JEMLI	Maître Assistante	FSGabes
Dorra AYADI-ZOUARI	Maître Assistante	FSGafsa
Fakher FRIKHA	Maître Assistant	FSS
Bahia AMOURI-AGREBI	Maître Assistante	ISBS
Fakher KAMOUN	Maître Assistant	ISBAM
Mehdi EL ARBI	Maître Assistant	ISBS
Kais EL ABES	Maître Assistant	ISSEEP
Hajer BEN HALIMA-SMAOUI	Assistante	FSGafsa
Fatma ELGHARBI	Post-Doc	CBS
Mouna SAHNOUN	Post-Doc	CBS
Manel BEN ALI	Post-Doc	CBS
Monia MEZGHANI-ABID	Technicien en Chef	CBS
Adel HADJ IBRAHIM	Technicien	CBS
Houda HMANI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Lobna DAOUED	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Hatem REKIK	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Rihab AMERI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Sahar TRABELSI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Mouna BEN ELHOUL	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Mouna JLIDI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Maroua OMRANE-BENMRAD	Thèse (Génie Chimique-Procédés)	ENIG
Sondes MECHRI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Sawssan NEIFAR	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Fouzia MESKHI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Fatma ABDMOULEH	Thèse (Génie Biologique)	ENIS

B-INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

Le nouveau laboratoire LBMIE vise à promouvoir la recherche dans le domaine des bioindustries, développer et adapter les techniques dans ce domaine et faciliter l'accès pour le
secteur industriel aux informations d'ordre technologique. Ainsi, nous espérons mettre à la
disposition du secteur économique des souches et des enzymes microbiennes d'intérêt
industriels. Ces enzymes sont obtenues soit par l'isolement de nouveaux microorganismes
producteurs ou alternativement par métagénomique fonctionnelle qui permet d'accéder à
l'information génétique des microorganismes environnementaux, cultivables ou non. Le crible
d'enzymes par l'une ou l'autre des stratégies sera suivit par une étude approfondie de leurs
propriétés physico-chimiques, cinétiques et structurales. La compréhension des déterminants
structuraux aidera à l'amélioration des performances de ces enzymes afin de mieux les adapter
aux conditions d'applications industrielles. L'optimisation des conditions de production ainsi que
la formulation de certaines de ces enzymes et leurs tests dans des applications industrielles font
partie de nos objectifs. Les enzymes ciblées sont celles destinées pour la détergence et la
tannerie, celles exploitées en agroalimentaire incluant les enzymes utilisables en tant qu'additifs

en panification pour améliorer la qualité du pain; les enzymes destinées à l'alimentation animale et celles destinées pour la production de sucres à pouvoir sucrant élevé et calorique faible. Sur un autre plan, nous envisageons d'utiliser les techniques microbiologiques enzymatiques et moléculaires pour proposer des solutions pour combattre le feu bactérien. Il s'agit de rechercher, étudier et tester des antagonistes bactériens principalement des endophytes et des phages qui sont capables de bloquer l'agent pathogène *Erwinia amylovora*.

Les travaux du LBMIE sont répartis en trois projets individualisés. Ainsi les détails des résultats obtenus au cours de l'année 2015 seront présentés suivant ces trois projets comme suit :

Projet 1: « Enzymes pour des additifs et des procédés en Agro-alimentaire: approches classique et métagénomique »

Responsables: Prof. Samir BEJAR & Dr. Aida Hmida SAYARI

Membres impliquées: Dr. F. EL GHARBI, Dr. M. SAHNOUN, Dr. H. BEN HLIMA, Dr. S. BEN MABROUK, Dr. S. JEMLI, Dr. D. ZOUARI AYADI, R. AMERI, S. TRABELSI & S. NEIFAR

Ce projet comporte plusieurs parties qui s'intéressent au criblage, l'étude l'amélioration et l'application de quelques enzymes destinées notamment à la panification et production de sucres à pouvoir sucrant élevée et faible valeur énergétique et pour l'alimentation animale.

1.1. Xylanases pour alimentation animale et panification

a) Expression et application de la xylanase de la souche Aspergillus niger US368

Dans un travail antérieur nous avons étudié la β -glucanase et la xylanase d'*A. niger* US368 (Hmida-Sayari et al., 2012 ; Elgharbi et al., 2013).

En 2015, l'ADNc de la xylanase produite par *A. niger* US368 a été amplifié et exprimé dans *E. coli* BL21 moyennant le vecteur PET 28a. La taille de l'enzyme purifiée a été estimée à 25 kDa. Les optima de température et de pH de l'enzyme sont respectivement de 50 ° C et 5. L'activité relative de la xylanase recombinante a été améliorée de 54% en présence de 3 mM de Cu²⁺ qui est un inhibiteur pour l'enzyme native. La modélisation moléculaire suggère que la région de contact entre le site catalytique et le peptide His-tag N-terminal apporté par le vecteur pourrait être responsable de la différence de comportement de l'enzyme native et recombinante (Elgharbi et al., 2015a).

Par ailleurs, la xylanase d'A. *niger* US368 a été également exprimée dans la levure *P. pastoris* en utilisant le vecteur constitutif pGAPZαB. En raison du nombre de copies variables de la cassette d'expression, les transformants positifs ont été testés sur milieux liquides pour déterminer les activités enzymatiques dans les surnageants des cultures. 11 clones (22,4%) ont montré une activité xylanase. La meilleure activité est obtenue avec le clone GX2 (41 U/ml). La xylanase recombinante purifiée a une masse moléculaire d'environ 24 kDa et des optima de température et de pH de 50 ° C et 4, respectivement. Cette enzyme a été utilisée comme additif dans le pain de blé entier à une très petite quantité (0,75 U/g de farine) et des améliorations significatives dans le volume et le volume spécifique du pain ont été enregistrées (Fig.1). L'enzyme a été également utilisé dans la digestion *in vitro* de l'orge et du son de blé conduisant à une diminution de la viscosité et une augmentation des sucres réducteurs et totaux (Elgharbi et al., 2015b).

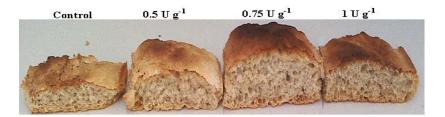


Figure.1: Effet de l'addition de la xylanase recombinante sur le volume du pain de blé entier.

b) Amélioration par voix génétique de la thermostabilité d'une xylanase de Trichoderma reesei

Dans le cadre d'un projet de collaboration entre la société Lesaffre internationnal et le LBMIE, nous avons tenté d'améliorer la thermostabilité de la xylanase (XYNII) produite par *Trichoderma reesei* Rut C30. Pour ce faire, une comparaison de séquences entre XYNII et les xylanases les plus thermostables a été réalisée et a montré que ces dernières possèdent des résidus Thr à la place des résidus Ser dans les positions 80, 146 et 149 à la surface de la protéine. Pour cette raison, nous avons opté pour une substitution de ces résidus Ser sélectionnés par des Thr en utilisant la technique de mutagenèse dirigée. Deux simples mutants S80T et S149T et un double mutant S80T- S149T ont été générés. L'étude de leurs propriétés physicochimiques a montré que le pH et la thermoactivité n'ont pas été touchés alors que leurs thermostabilités sont nettement améliorées par rapport au sauvage. Le double mutant est également plus stable à 60°C que les simples mutants et le sauvage puisqu'il garde 60% de son activité après 5 min d'incubation contre 45%, 41% et 32% pour les simples mutants S80T et S149T et le sauvage respectivement (Zouari-Ayadi et al., 2015).

c) Exploration par métagénomique fonctionnelle du microbiote intestinale du Dromadaire pour le screening d'enzymes pour alimentation animale

Ce nouveau projet vise à appliquer la stratégie d'exploration fonctionnelle d'écosystèmes microbiens au microbiote digestif du dromadaire, pour découvrir de nouvelles carbohydrolases (notamment des glucanases, des cellulases et des xylanases) efficaces pour l'alimentation animale en particulier et pour la dégradation des lignocelluloses en général. En effet, cet animal est capable de digérer la paroi végétale de végétaux ligneux bien plus efficacement que la plupart des autres ruminants. Afin d'accéder au microbiote intestinal de cet animal, nous avons collecté des excréments de quelques individus en liberté dans le Sahara Tunisien. A partir de ces échantillons nous avons alors préparé de l'ADN. Utilisant la technique d'amplification des gènes 16S suivit de la séquence par le NGS du CBS nous avons obtenue une idée globale sur la diversité de ce microbiote (**Fig. 2**).



Figure 2 : Biodiversité bactérienne dans le microbiote intestinal du dromadaire

Par ailleurs, des fragments de 35 à 40 kb ont servi pour préparer plusieurs banques métagénomiques utilisant le vecteur Pcc1FOS. La meilleure de ces banques contient environ 17000 clones qui devraient porter environ 680 MB soit l'équivalent de 155 fois le génome d'*E. coli*. La majeure partie de cette banque a été criblée en haut débit au LISBP (Toulouse France) lors d'un stage réalisé par Mme Rihab Ameri utilisant des substrats lignocellulosiques chromogènes. Les résultats obtenus sont très encourageants puisque nous avons pu obtenir de

nombreux clones positifs dans un premier test. Après validation des tests nous avons regardé le profil digestif pour détecter les redondances. Plusieurs clones ainsi vérifiés vont être maintenant séquencés par le NGS du CBS afin de déterminer la séquence des inserts et faire l'annotation (en cours). L'expression de certaines des enzymes, l'étude de leurs activités et de leurs séquences et structures font partie de nos objectifs immédiats.

1.2. Amylases améliorant de panification

Parmi les enzymes les plus utilisées en panification, les amylases « améliorant de panification », qui sont actuellement importée en Tunisie. Elles permettent de standardiser les farines et de palier aux déficiences d'α-amylases endogènes. Dans le cadre de ce projet, nous avons isolé dans un travail antérieur une souche identifiée comme *Aspergillus oryzae* S2 productrice de ce type d'enzyme. Cette souche produit deux isoformes nommées AmyA et AmyB en culture liquide et un troisième AmyC en fermentation semi-solide (FSS). Nous avons réussit l'amplification et le séquençage du gène d'α-amylase d'*A. oryzae* S2 qui renferme 8 introns et 9 exons qui coderaient pour une protéine de 500 acides aminés. Au cours de 2015, nous avons tenté l'expression du cDNA dans *E. coli* (en cours) et nous avons étudié le processus de génération d'AmyB à partir de la forme natif AmyA. Au fait, nous avons montré qu'il y a réellement 3 isoformes AmyB, AmyB1 et AmyB2 de taille 42, 40 et 43 kDa respectivement provenant d'un clivage chymotrypsique. Ceci a été corroboré par la mise en évidence des sites de clivage potentiel générant respectivement AmyB, AmyB1 et AmyB2.

Ce travail a généré une publication (Sahnoun et al., 2015) en plus d'une autre en cours de révision dans PloS ONE.

Projet 2: Enzymes d'intérêt industriel pour la détergence et la tannerie

Responsable du projet: Dr. Bassem JAOUADI

Chercheurs impliquées: Pr. S. Bejar, Pr. A. Sayari, Dr. N. Zaraî Jaoaudi, Dr. M. Ben Ali, A. Hmida Sayari, Dr. H. Ben Hlima, Dr. F. Kamoun, Dr. F. Frikha & Dr. D. Ayadi Zouari

Doctorants mobilisés: H. Rekik, M. Ben Elhoul, M. Omrane Benmrad, S. Mechri & L. Daoud

Ce projet comporte plusieurs parties qui s'articulent autour de deux thématiques d'enzymes microbiennes notamment les protéases (subtilisines et kératinases) et les peroxydases (à acides humiques HaP et de lignine LiP) d'intérêt industriel dans la formulation des détergents de lavage et dans le traitement du cuir. Il s'agit de mettre à la disposition du secteur économique des enzymes microbiennes (protéases et peroxydases) pour les dites applications pour remplacer les produits chimiques polluants et toxiques, traditionnellement utilisés dans ces industries.

1.1. Les protéases (subtilisines et kératinases) microbiennes

Actuellement, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques. En effet, ce groupe d'hydrolases couvre 65% du marché total des enzymes. Parmi les applications de ces protéases visées par ce projet celles utilisées en détergence et dans le traitement du cuir (tannerie). La transformation des peaux brutes en cuir fini passe par plusieurs étapes dont les opérations de rivières (le confitage et l'épilage-pelanage enzymatique). Dans ce projet, en plus des enzymes pour l'étape de confitage, on vise le criblage et l'étude des protéases qui accomplissent l'étape d'épilage qui consiste à éliminer les poils ou la laine ainsi que l'épiderme de la peau suite à une hydrolyse des liaisons peptidiques. Outre ses avantages pour l'environnement, le traitement enzymatique diminue les

coûts et améliore la qualité du produit fini qui devient plus résistant à la déchirure et présentant une teinte plus uniforme.

a) Tests à l'échelle industriel en tannerie de la SAPB et la SAPB-L31I/T33S/N99Y

Au cours de l'année 2015 et dans le cadre de la clôture de notre projet PNRI-Enzymes en collaboration avec le Centre National de Cuir et de la Chaussure (CNCC) à Mégrine (Ben-Arous) et la société SO. SA. CUIR (M'Saken, Sousse), nous avons validé les essais des opérations d'épilage et de confitage, par le test des poches d'air (**Fig. 3**), à l'échelle industrielle moyennant les enzymes SAPB et SAPB-L31I/T33S/N99Y issues des souches *B. subtilis* DB430 hébergent respectivement les plasmides pNZ1 et pNZ2.













Figure 3: Validation du procédé de confitage enzymatique moyennant la protéase triple mutante SAPB-L31I/T33S/N99Y, par le test des poches d'air.

On peut conclure que l'enzyme SAPB-L31I/T33S/N99Y est efficace à une concentration de 1,4% de masse, pendant une durée de 45 min, à une température constante de 35 °C et avec une longueur de bain égale à 100 % en masse de peau en tripe.

b) Evaluation des performances kératinolytiques de la collection des kératinases bactériennes du LBMIE-CBS dans la biodégradation et le traitement des plumes de volailles (canards et poulets) de la Sté Française Ovalie-Innovation

Dans le cadre d'une prestation de services, en 2015, avec la société Française Ovalie-Innovation, sur la valorisation et le traitement enzymatique de lots de plumes de canard et de poulet par les kératinases (rSAPB, SAPB-N99Y et rKERUS), nos résultats montrent que nos kératinases sont capables de faire une solubilisation complète des plumes de canard ou de poulet comme il a été observé à l'œil nue. Ceci se traduit par des degrés d'hydrolyse variant de 15 à 35% et par une quantité de protéines solubles allant de 2,95 à 7,68 g/L. L'étude des acides aminés libres générés et de leurs concentrations montrent que c'est assez variable selon le type de plumes et la kératinase utilisée. Ainsi, nous pouvons constater également que l'hydrolysat des plumes de canard par la rSAPB montre une richesse en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) et aromatique (tryptophane) par rapport à celui sur plumes de poulet.

1.2. Les peroxydases (à acides humiques HaP et de lignine LiP) microbiennes

Ce nouveau projet vise à produire et à mettre à la disposition de l'industriel des détergences des préparations enzymatiques à base de peroxydases pouvant être utilisées comme agent de blanchissement à la place des perborates de sodium permettant d'obtenir un haut niveau de performance du détergent pour éliminer les taches, préserver l'éclat des couleurs et lutter contre la re-déposition de la saleté tout en respectant l'environnement. Durant, l'année 2015, nous avons purifié et caractérisé une nouvelle peroxydase nommée LiP-SN à partir de la souche d'actinomycète *S. griseosporeus* SN9, isolée à partir du sol salé et saharien humide du sud-ouest tunisien (région Naîcha, Jemna du gouvernorat de Kebili). Il s'agit d'une protéine monomérique ayant une masse moléculaire apparente de 40 kDa et possède une valeur de Reinheitzahl (RZ) de 1,63. Cette enzyme présente une activité peroxydasique révélée sur zymogramme utilisant l'odianisidine. La caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée nous a permis de conclure que les optima de pH et de température sont de 8,5 et 65 °C sur 2,4-dichlorophénol. Il s'agit d'une

hémoperoxydase qui catalyse l'oxydation d'une large gamme de substrats en présence de H_2O_2 . Cette enzyme est inhibée par l'azide de sodium et le cyanure, ce qui indique la présence des composants de l'hème dans sa structure tertiaire. L'enzyme LiP-SN obéit à la cinétique de Michaelis-Menten et montre des valeurs d'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) élevées que celles des peroxydases HaP4 (Jaouadi et al., 2014) et HRP. La LiP-SN active et stable en présence des agents oxydants et dénaturants et montre une compatibilité significative avec les détergents de lavage et donc pourrait être une candidate potentielle en détergence. Ainsi, l'utilisation de ce type d'enzymes devient une solution prometteuse et innovante qui permet de développer des procédés plus spécifiques, très sélectifs, moins polluants et d'effectuer les réactions dans des conditions plus douces.

En 2015, ce travail a abouti à la publication de 5 articles, de 2 chapitres dans des livres scientifiques en plus de 2 brevets d'invention INNORPI.

Projet 3: « Ciblage enzymatique, microbien et biochimique du pouvoir pathogène d'Erwinia amylovora »

Responsables: Dr. Mamdouh BEN ALI

Chercheurs impliquées: Dr. Mehdi El ARBI, Dr. Kais EL ABED Dr. Hmida Sayari, Dr. Manel BEN AL

Doctorants mobilisés: Lobna DAOUD, Houda HMANI, Adel Hadj BRAHIM, Faouzia MESKHI

Le feu bactérien est une maladie nécrotique dévastatrice, entraînant de graves pertes économiques pour l'industrie de la pomme et de la poire causée par *Erwinia amylovora*. La pathogénie et la virulence d'*E. amylovora* dépend de différents facteurs. Toutefois, les facteurs les plus importants enregistrés suite à la comparaison entre des souches virulentes et avirulentes d'Erwinia réside dans deux facteurs essentiels : la synthèse d'exopolysaccharides levane et Amylovoran et le mécanisme du système de sécrétion de type III (T3SS) et des protéines associées.

La stratégie adoptée au cours de ce nouveau projet s'inscrit dans le cadre de la lutte biologique. Elle sera basée sur la recherche, l'étude et l'application d'antagoniste bactérien principalement des endophytes et des bactériophages qui sont capables de bloquer Erwinia amylovora ou autres espèces d'Erwinia qui seront révélées au cours de l'étude. Cette démarche n'a jamais été abordée et nous espérons être les pionniers dans cette démarche. La lutte biologique avec des bactériophages commence d'être exploré et le domaine de la manouvre est trop vaste et présente plusieurs avantages. En effet les phages sont considérés comme naturels et ubiquitaires, et représentent le groupe le plus abondant d'entités biologiques dans notre environnement. Leur isolement, la production et le stockage sont relativement simples et peu coûteux. Elles sont considérées comme des outils respectueux de l'environnement pour le contrôle des bactéries pathogènes. Notre stratégie dans ce sens vise le criblage, et pour la première fois en Tunisie, de notre écosystème afin d'isoler les bactériophages d'Erwina qui évoluent au niveau des zones infectés et ailleurs. Les isolats feront l'objet de toute une étude de classification de spécificité et voire même de séquençage du génome. Le but est de sélectionner des phages locaux adaptés à notre environnement et qui seront capables de faire face à l'émergence de souches résistantes et aux facteurs environnementaux.

Ce projet vient de commencer juste avec le nouveau contrat programme du LBMIE 2015 -2018 et les résultats sont encore préliminaires. Cependant, au cours de 2015, nous avons réussit l'isolement de plusieurs souches *Erwinia amylovora* à partir de plusieurs endroit touchés ou non par le feu bactérien. Ces souches sont entrain d'être identifiées et classifiées afin de déterminer leur phylogénie et les relations potentielles avec la pathogénicité. Cette collection de souches constituera une base pour les études futures.

Par ailleurs, nous avons pu isoler plusieurs bactériophages d'*Erwinia amylovora* à partir de plusieurs biotopes. Ces phages ont montré une spécificité pour la souche hôte puisqu'elles sont capables de donner des plages de lyse sur un tapis de cette souche. L'identification de ces bactériophages, l'étude de leurs spécificités fines sont en cours afin de se préparer à leurs tests pour la lutte biologique contre le feu bactérien

C- Productions scientifiques, conventions et collaborations

1. Publications parues en 2015 dans des revues scientifiques indexées (à IF)

- 1) Jemli S, Ayadi-Zouari D, Hlima HB & Bejar S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Crit Rev Biotechnol.* 36 (2016) 246-258.
- 2) Zouari Ayadi D, Hmida Sayari A, Ben Hlima H, Ben Mabrouk S, Mezghani M & Bejar S. Improvement of *Trichoderma reesei* xylanase II thermal stability by serine to threonine surface mutations. *Int J Biol Macromol.* 72 (2015) 163-170.
- 3) Elgharbi F, Hlima HB, Farhat-Khemakhem A, Ayadi-Zouari D, Bejar S & Hmida-Sayari A. Expression of *A. niger* US368 xylanase in *E. coli*: Purification, characterization and copper activation. *Int J Biol Macromol.* 74 (2015a) 263-270.
- 4) Elgharbi F, Hmida-Sayari A, Zaafouri Y & Bejar S. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion. Int J Biol Macromol. 79 (2015b) 103-109.
- 5) 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.* 75 (2015) 73-80.
- 6) Zaraî Jaouadi N, Rekik H, Ben Elhoul M, Zohra Rahem F, Gorgi Hila C, Slimene Ben Aicha H, Badis A, Toumi A, Bejar S & Jaouadi B. A novel keratinase from *Bacillus tequilensis* strain Q7 with promising potential for the leather bating process. *Int J Biol Macromol.* 79 (2015) 952-964.
- 7) Ben Elhoul M, Zaraî Jaouadi N, Rekik H, Bejar W, Boulkour Touioui S, Hmidi M, Badis A, Bejar S & Jaouadi B. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *Int J Biol Macromol.* 79 (2015) 871-882
- 8) Boulkour Touioui S, Zaraî Jaouadi N, Boudjella H, Ferradji FZ, Belhoul M, Rekik H, Badis A, Bejar S, Jaouadi B. (2015) Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from *Streptomyces* sp. strain AH4. *World J Microbiol Biotechnol.* 31 (2015)1079-1092.
- 9) Bouacem K, Bouanane-Darenfed A, Laribi-Habchi H, Elhoul MB, Hmida-Sayari A, Hacene H, Ollivier B, Fardeau ML, Jaouadi B & Bejar S. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Caldicoprobacter guelmensis. Int J Biol Macromol. 81 (2015) 299-307
- 10) Rekik H, Zaraî Jaouadi N, Bejar W, Kourdali S, Belhoul M, Hmidi M, Benkiar A, Badis A, Sallem N, Bejar S & Jaouadi B. Characterization of a purified decolorizing detergent-stable peroxidase from Streptomyces griseosporeus SN9. Int J Biol Macromol. 73 (2015) 253-263.
- 11) Ammar A, Chtourou H, Hammouda O, Trabelsi K, Chiboub J, Turki M, AbdelKarim O, El Abed K, Ben Ali M, Hoekelmann A & Souissi N. Acute and delayed responses of C-reactive protein, malondialdehyde and antioxidant markers after resistance training session in elite weightlifters: Effect of time of day. *Chronobiol Int.* 32 (2015) 1211-1222.

2. Articles/chapitres d'ouvrages scientifiques parus en 2015

1. Nadia Zaraî Jaouadi, Hajer Ben Hlima, Hatem Rekik, Mouna Belhoul, Maher Hmidi, Houda Slimene Ben Aicha, Chiraz Gorgi Hila, Abdessatar Toumi, Nushin Aghajari, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. Probing the crucial role of Leu31 and Thr33 of the Bacillus pumilus CBS alkaline protease in substrate recognition and enzymatic depilation of animal hide. *III International Leather*

Engineering Congress: Innovative Aspects for Leather Industry (IAFLI), May 21-22, 2015, Edited by Prof. Huseyin Ata KARAVANA, Ege University Engineering Faculty Leather Engineering Department Publishing, ISBN: 978-605-338-130-3, (2015) pp. 73-83. Izmir - TURKIYE.

- 2. Nadia Zaraî Jaouadi, Chiraz Gorgi Hila, Houda Ben Aicha, Abdessatar Toumi, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities in leather tannery. *III International Leather Engineering Congress: Innovative Aspects for Leather Industry (IAFLI), May 21-22, 2015*, Edited by Prof. Huseyin Ata KARAVANA, Ege University Engineering Faculty Leather Engineering Department Publishing, ISBN: 978-605-338-130-3, (2015) pp. 157-166. Izmir TURKIYE.
- 3. Brevets d'inventions déposés (INNORPI et autres organismes internationaux)
- 1 Mouna Ben Elhoul, Nadia Zaraî Jaouadi, 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 N° de dépôt TN2015/0206 du 25 Mai 2015.
- Nadia Zaraî Jaouadi, Hatem Rekik, Mouna Belhoul, Fatma Zohra Rahem, Chiraz Gorgi Hila, Houda Slimene Ben Aicha, Abdelmalek Badis, Abdessatar Toumi, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. Une nouvelle kératinase nommée KERQ7 produite par la souche de *Bacillus tequilensis* Q7: Candidate très efficace pour le confitage enzymatique lors du traitement des cuirs ayant une efficacité catalytique et un degré d'hydrolyse très importants par rapport aux enzymes commerciales. *Brevet d'Invention INNORPI Tunisie* N° de dépôt TN2015/0157 du 24 Avril 2015.

3. Thèses de doctorat es-sciences soutenues

ELGHARBI Fatma: Titre du sujet : « Criblage, étude, expression et application de β-glucanases et xylanases microbiennes » (**ENIS: Thèse en Génie Biologique : 19/09/2015**).

4. Mastères de recherche soutenus

MECHERI Sondes: Titre du sujet : « Purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle protéase d'*Aeribacillus pallidus* VP3 d'intérêt biotechnologique dans la détergence et la synthèse peptidique» (FSS: LMD en Biotechnologie Microbienne: 26 /10/2015)

5. Organisation des manifestations scientifiques

Organisation des 14^{èmes} journées Internationales de Biotechnologie (**JIB 2015**) l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) du 20 au 24 décembre 2015 à Djerba-Tunisie

Prof. BEJAR Samir: Coordinateur des JIB 2015; Prof. SAYARI Adel et Dr. JAOUADI Bassem: Membres du comité scientifique et d'organisation des JIB 2015.

- 6. Conventions/contrats signés en 2015 avec des partenaires socio-économiques nationaux
- 1. Programme National de Promotion de l'Innovation Technologique « PNRI-ENZYMES » 2012-2015/CNCC-CBS-SO.SA.Cuir: « Criblage, étude, amélioration et applications de protéases pour les opérations de rivière (confitage et épilage-pelanage enzymatique) en tanneries mégisseries » Montant du financement pour l'année 2015 en DT: 24 600
- 2. Contrat de Prestation de Services pour 6 mois entre le LBMIE/CBS et la Société Française OVALIE INNOVATION, signé le 12/01/2015, intitulé : « Traitement enzymatique de lots de plumes de canard et de poulet par une kératinase bactérienne ». Montant du financement pour l'année 2015 en euros: 5 500
- 7. Conventions signées en 2015 dans le cadre des projets de coopération scientifique bilatérale.

Projet de Recherche conjoint 2012-2016 Tuniso-Algérien « TNDZ-MicrooZymes JAOUADI/BADIS, Code: TA/04/2012», intitulé: «Criblage, étude biochimique et moléculaire, amélioration et application industrielle et environnementale de protéases et peroxydases de microorganismes pour la détergence, la tannerie et le biotraitement des eaux de mer polluées».

Montant du financement pour l'année 2015 en DT : 10 000

LR15CBS07 : Laboratoire de de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire (LPCMC)

مخبرأساليب الغربلة الجزيئية والخلوية

Responsable: Pr. Ahmed REBAI

Email: ahmed.rebai@cbs.rnrt.tn

LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Chercheurs:

Professeurs: Mohamed Sami Aifa, Saber Masmoudi, Hammadi Ayadi, Hassen Hadj Kacem *Maitre-Asistants*: Najla Kharrat, Sami Mnif, Mariem Ben Said, Mohamed Ali Mosrati, Dorra Idris, Imen Ayedi, Salima Belguith-Maalej, Imen Benrebeh, Leila Ayedi, Boutheina Cherif, Heni Bouhamed, Lobna Bouchaala, Soumaya Triki,

Cadres techniques et administratif:

Ingénieurs: Bochra Mellouli, Riadh Ben Marzoug

Techniciens: Salma Zouari, Fida Jbeli

Secrétaire: Monia Mlaouh

Post-doctorants: Rayda Ben Ayed, Aissette Baanannou, Molka Feki, Jihéne Elloumi, Rania

Abdelhedi, Rihab Kallel.

Etudiants en thèse: Karim Jalleli, Imen Chakchouk, Faten Rmida, Sabrine Bel Mabrouk, Fatma Trigui, Hela Gargouri, Emna Ayedi, Rania Ammar, Faten Abdelli, Marwa Jardak, Amal Bouzid, Amel Louhichi, Mariem Ayedi, Mariem Moala, Afef ElAyeb, Asma ElAyeb

OBJECTIF GENERAL

Les activités du laboratoire s'inscrivent dans le cadre d'une vision intégrative des pathologies humaines complexes et de l'authentification dans leurs divers aspects. Il vise à valoriser les connaissances produites par le laboratoire pour le développement de procédés de criblage moléculaire et cellulaire et notamment des méthodes, outils et kits de diagnostic à usage médical ou alimentaire et des systèmes cellulaires de criblage des biomolécules à potentiel thérapeutique. La complémentarité des compétences des chercheurs dans des domaines clés comme la génomique, la protéomique et la bioinformatique sont mises en valeur dans les actions proposées qui visent à fournir à l'issue de ce programme des découvertes (brevets) et des produits valorisables en industrie pharmaceutique, paramédicale et agro-alimentaire.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Evaluer l'association entre les facteurs de risque environnementaux et les biomarqueurs inflammatoires impliqués dans les maladies coronariennes.
- Elaborer un schéma illustrant le mécanisme physiopathologique du psoriasis et valoriser les résultats obtenus par la sélection de quelques biomarqueurs de diagnostic.
- Etudier l'environnement cellulaire et déterminer les caractéristiques histologiques et anatomopathologiques et moléculaires des tumeurs du cancer du sein, contribuer à la standardisation d'une classification prédictive du cancer du sein et concevoir une puce avec les mutations les plus indicatives dans la population tunisienne.
- Validation des biomarqueurs identifiés pour les maladies thyroidiennes auto-immunes par des tests simplex et mise au point d'une approche intégrée pour l'interprétation des résultats et l'identification des réseaux moléculaires effecteurs.
- Identification de nouveaux gènes du diabète monogénique par séquençage extentif des régions chromosomiques candidates.
- Construction d'une bibliothèque de molécules intéressantes ayant des activités contre la formation des biofilms qui sont meilleurs ou comparables aux molécules disponibles sur le marché.
- Sélectionner des inhibiteurs spécifiques des voies de la MAP kinase et de la PI3 kinase en plus des antagonistes à l'EGFR et réaliser un test d'inhibition in vitro des kinases impliquées en cancer.

- Développer une librairie de siRNA spécifiques pour l'atténuation de l'expression du gène SLC26A4 et des outils de vectorisation des siRNA vers des organes cibles moyennant des nanoparticules. Tester les molécules thérapeutiques développées sur le poisson Zébre.
- Développer et produire des molécules thérapeutiques pour les maladies inflammatoires du système respiratoire présentant un potentiel de transfert sur des mammifères modèles.
- Valider pour commercialisation la biopuce à oligonucléotides spécifique des mutations responsables de surdités de l'enfant dans l'Afrique du nord.
- Développer un kit d'enrichissement pour séquençage haut débit de toutes les régions mutantes décrites chez des patients Nord Africains.
- Valider de nouveaux biomarqueurs de la prebyacousie par microarrays, PCR temps réel et utilisation de modèles animaux.
- Cribler des molécules thérapeutiques de la presbyacousie chez le poisson zèbre Knock down et confirmation chez la souris.
- Développer des kits basés sur l'amplification PCR de régions génomiques spécifiques pour d'authentification des produits alimentaires (huile d'olive, produits carnés) et l'identification individuelle dans le domaine forensique.

LISTE DES PROJETS ET PRINCIPAUX OBJECTIFS

Projet 1 : Identification, Criblage et validation de biomarqueurs de maladies multifactorielles, Responsables : Najla Kharrat & Ahmed Rebai.

Projet 2 : Ciblage des voies de signalisation impliquées dans la résistance microbienne : cas du biofilm microbien, Responsables : Sami Mnif & Sami Aifa.

Projet 3 : Ciblage des voies de signalisation mammifère, Responsable : Sami Aifa.

Projet 4 : Développement et application des molécules de synthèses pour la thérapie, Responsable: Hassen Hadj Kacem.

Projet 5 : Développement de deux kits d'aide au diagnostic moléculaire et Criblage de molécules thérapeutiques des surdités par des technologies haut débit. Responsable: Saber Masmoudi.

Projet 6 : Développement de kits pour l'authenticité moléculaire. Responsable : A. Rebai

Projet 1: Identification, Criblage et validation de biomarqueurs de maladies multifactorielles

La première action consiste à étudier l'association entre les facteurs de risque environnementaux et les biomarqueurs inflammatoires impliqués dans les maladies coronariennes. Cette action fait suite à une action précédente sur ces maladies qui a fait l'objet d'une thèse de doctorat sur le rôle des polymorphismes des gènes des cytochromes P450 et des cibles thérapeutiques dans la réponse aux traitements dans les maladies coronaires. La première étape du projet a consisté à concevoir une enquête sur les « habitude alimentaire des patients » en collaboration avec des professionnels de la diététique et du service de cardiologie de l'hôpital de Hédi Chaker et l'équipe d'histologie de la faculté de médecine de Sfax. Nous avons ainsi pu fixer les critères requis pour une stratification de malades coronariens selon le degré de complication et par conséquent cinq groupes de patients se sont distingués. Le projet a obtenu l'accord du comité d'éthique de l'hôpital de Hédi Chaker. Le protocole de collecte a été minutieusement choisi selon la faisabilité de la technique et la disponibilité des appareillages au Centre de

Biotechnologie de Sfax. Nous sommes actuellement en phase de collecte des prélèvements biologiques et des fiches d'enquête.

Pour le travail sur le cancer du sein de la femme jeune, l'expression de 6 bio-marqueurs (a été testée dans une série de 200 patientes. L'analyse des données a montré l'expression différentielle de certains marqueurs selon le profil de la tumeur et leur intérêt en pronostic est en cours d'investigation.

Projet 2 : Ciblage des voies de signalisation impliquées dans la résistance microbienne : cas du biofilm microbien,

Purification et élucidation structurale des molécules à partir des endophytes: Les endophytes sont des micro-organismes qui colonisent les tissus intérieurs de la plante essentiellement des feuilles, des tiges et des racines sans provoquer des symptômes apparents chez la plante hôte. Ces micro-organismes sont des synthétiseurs chimiques à l'intérieur de la plante et sont reconnus comme une source de métabolites secondaires pouvant être utilisés en tant que sources potentielles de produits pharmaceutiques (exemple: agents anti-biofilm). Dans ce cadre, une collection de champignons et bactéries endophytes a été construite (2014-2015). En vue de purifier les molécules présentes dans un des extraits bruts des endophytes, une analyse de l'extrait acétate d'éthyle ainsi que l'extrait contrôle du milieu de culture par HPLC analytique a été effectuée. L'analyse du spectre d'absorption de l'extrait pour déterminer la longueur d'onde adéquate avec laquelle la majorité des pics absorbent a été réalisée. Cette étape a été suivie par une extraction en phase solide pour séparer les fractions présentes dans l'extrait. Le reste du travail a été effectué avec une seule fraction qui présente la majorité des molécules. La comparaison entre le profil en CAD (Charged Aerosol Detector) et en UV-visible de cette fraction a servi pour la détermination des pics majoritaires et par la suite leurs analyses et leurs collectes en HPLC préparative. Un contrôle de profils des différentes molécules séparées a été réalisé pour vérifier leur pureté. Les molécules ainsi purifiées ont été analysé par RMN et l'interprétation des résultats est en cours de réalisation. Les activités anti-biofilm de ces molécules vont être évaluées prochainement. Cette partie a été effectuée uniquement pour la souche Alternaria sp. 40 et la même démarche sera effectuée avec les extraits des autres souches de la collection.

Mise au point des manipulations de formation des biofilms et des moyens de quantification : Cette partie a été consacrée à la construction d'une collection de souches bactériennes productrices de biofilm. Pour ceci, 18 souches bactériennes ont été isolées d'un film microbien collecté à partir de toit de maison localisé dans la région de Sfax. La pureté de ces souches a été confirmée moyennant des observations microscopiques après repiquages successifs sur milieu TSB. La formation de biofilm a été estimée moyennant des tests préliminaires à savoir l'adhésion sur lame de verre, le test de mobilité cellulaire, l'adhésion aux solvants, l'adhérence sur tube et la méthode de l'agar au rouge Congo. Ces tests n'ont pas abouti à des résultats significatifs. Pour ceci, nous avons évalué la formation de biofilm moyennant les tests sur microplaques tout en utilisant le cristal violet et la résazurine comme révélateurs. Les résultats obtenus ont montré que la souche S61 est capable de former un biofilm mature après 24h (DO₅₇₀=4.87). La viabilité au sein du biofilm formé mesuré avec la fluorescence (avec resazurine) a été de 1,47. 10³. Cette constatation a été confirmée aussi par microscopie confocale moyennant l'utilisation du kit de viabilité bactérienne. La souche S61 a été identifiée comme *Staphylococcus epidermidis*. Dans le

film bactérien étudié, elle est la souche la plus filmogène et serait utilisée comme modèle bactérien dans nos futures études sur les activités anti-biofilm.

Projet 3 : Ciblage des voies de signalisation mammifère.

Notre travail est basé sur le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) comme cible thérapeutique en cancer solide. L'EGFR possède un domaine de fixation de la calmoduline (CaM-BD) et un domaine calmoduline-like (CaM-LD) respectivement en amont et en aval du domaine tyrosine kinase. Nos travaux antérieurs ont montré que la délétion du CaM-BD (chargé positivement) abolit l'activité tyrosine kinase d'EGFR (Aifa et al., 2005). Durant cette année nous avons montré que la délétion de CaM-LD (chargé négativement) tout en gardant un seul acide aminé négatif (glutamate), réduit l'activité tyrosine kinase da façon drastique surtout la trans-autophosphorylation. En plus la substitution de CaM-LD par un peptide riche en His/Val cause l'inactivation complète.

L'utilisation du microscope confocal et la cytométrie en flux démontre que la protéine de fusion EGFR-GFP en présence de la délétion de CaM-BD (EGFR/CaM-BD Δ) ou la délétion CaM-LD (EGFR/CaM-LD Δ) ou la substitution par le peptide His/Val (EGFR/InvCaM-LD) fixe l'EGF marqué par le téraméthyl rhodamine (TMR-EGF) et se localise au niveau de la membrane plasmique come l'EGFR wild-type. Toutefois seuls l'EGFR/CaM-LD Δ et l'EGFR/InvCaM-LD subissent une internalisation ligand-dépendante tandis que l'EGFR/CaM-BD Δ demeure membranaire (Figure 1).

Nous avons mené des études de modélisation *in silico* supportant une interaction électrostatique entre CaM-BD et CaM-LD dans la structure asymétrique du dimère d'EGFR responsable de l'activation asymétrique. Nous suggérons, par conséquent, le ciblage de ces deux domaines afin d'inactiver l'EGFR en cancer solide.

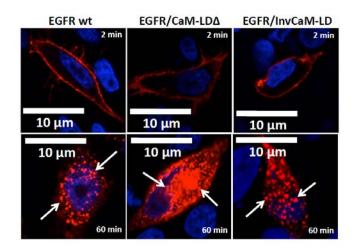


Figure 1: EGFR/CaM-BD∆ et EGFR/InvCaM-LD preservent l'internalization liganddépendente. Les cellules CHO ont été transfectées transitoirement par les mutants EGFR/CaM-BDA et EGFR/InvCaM-LD et l'EGFR Wild type. Après 24H les cellules sont incubées en présence de TMR-EGF durant 2 min ou 60 min comme c'est indiqué, fixées et préparées pour observation en microscope confocal. Les images montrent le signal TMR-EGF (rouge). Les flèches montrent l'internalisation de TMR-EGF en vésicules d'endosome.

Projet 4 : Développement et application des molécules de synthèses pour la thérapie.

Le gène *SLC26A4* (PDS) code pour la pendrine, une protéine transmembranaire qui joue le rôle d'un transporteur d'anion. Récemment, des études sur le modèle murin ont rapporté l'effet pathologique de la surexpression de cette protéine sur les maladies respiratoires. Dans ce projet nous visons d'une part, la conception et l'utilisation des petits ARN interférents (siRNA: small interfering RNA) pour réduire l'expression du gène *SLC26A4* impliqué dans l'émergence de pathologies humaines multifactorielles et respiratoires et d'autre part le développement d'outils

de vectorisation à partir d'une nanothèque de particules pour améliorer le ciblage des tissues morbides et la stabilité des siRNAs.

Développement et validation à haut débit d'une librairie de siRNA pour l'atténuation de l'expression du gène SLC26A4 dans des cellules épithéliales de poumons humains: La conception de nouvelles siRNA est une étape cruciale et très délicate. Pour ce faire, une étude bioinformatique movennant plusieurs algorithmes et programmes a été effectuée. Les siRNA obtenus ont été comparés les uns par rapport aux autres à fin d'obtenir des critères plus généraux qui seront la base de la structure générale de siRNA recherchée. Un premier lot de cinq siRNA a été sélectionné avec les séquences témoins respectives. L'étude in silico a été suivie d'une étude in vitro, sur des cellules HeLa, afin de tester l'efficacité de deux siRNA à cibler l'ARNm du gène SLC26A4. Un microgramme d'ADN plasmidique de chaque construction (siRNA1 et siRNA2) a servi pour réaliser la transfection des cellules HeLa en culture. Une construction de la séquence sauvage du gène a été utilisée pour suivre l'effet d'atténuation après co-transfection. Après 48h de transfection, les ARNs et les protéines totaux ont été extraits et l'effet des siRNAs sur l'expression du gène a été comparé au niveau d'expression obtenu par les cellules transfectées uniquement par la construction sauvage. L'analyse ciblée par RT-PCR a montré l'absence d'ARNm du gène sous l'effet des deux siRNAs. Cependant, seules les cellules non transfectées par les siRNAs ont exprimé l'ARNm du gène SLC26A4. Dans toutes ces analyses nous avons utilisé l'ARN 18S comme témoins positif de la réaction. D'autre part, l'analyse par western blot a révélé la présence de deux bandes de tailles 85 et 110 kDa dans le cas du sauvage correspondant respectivement à la forme normale et glycosylée de la pendrine. Par contre, la protéine n'a pas été détectée chez les cellules transfectées par les siRNAs. Ainsi, on peut conclure que ces deux nouvelles siARNs permettent une inhibition efficace de l'expression du gène SLC26A4. Avoir deux siRNAs efficaces et spécifiques du gène SLC26A4 est encourageant pour tester d'autres siRNAs et valider les résultats sur des cellules épithéliales de poumons humains.

Criblage et couplage des nanoparticules pour une meilleur vectorisation, traçabilité et stabilité des oligonucléotides: La recherche sur les pathologies humaines se tourne vers le développement de la nanomédecine. Cependant l'utilisation des nanoparticules n'est envisageable qu'une fois que leur innocuité est vérifiée. Parmi la grande panoplie de nanoparticules que nous disposons, nous avons choisi de commencer par tester la cytotoxicité de : 'LaVO₄:Eu 5%' et 'CeVO₄:Eu 5%'. L'appartenance à la famille des lanthanides leur confère une forte émission de lumière visible ou infra-rouge. Des tests de cytotoxicité (MTT), réalisés, in-vitro, sur des cellules humaines en culture ont dévoilé une faible toxicité de ces nanoparticules. En effet, sur six combinaisons possibles (application, pendant 24h, des deux nanoparticules sur trois lignées cellulaires (HeLa, MCF7 et Hek293)), la concentration inhibitrice médiane (CI50) n'a été atteinte qu'avec la LaVO₄:Eu 5% et les cellules Hek293. L'étude de la cinétique d'action de CeVO4 :Eu5% sur les cellules MCF7 ne nous permet d'atteindre la CI50 qu'après augmentation du temps d'exposition cellulaire (jusqu'à 96 h).

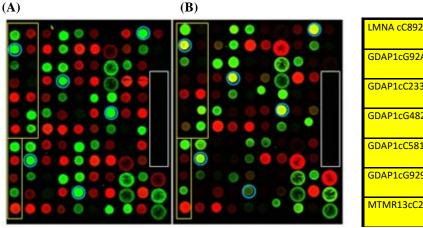
Des tests d'immunofluorescence ont été réalisés sur les cellules Hek293 et MCF7 en contact avec la CI50 de LaVO₄:Eu5%, ou la concentration la plus proche de CI50 de CeVO₄:Eu5%. Les résultats montrent bien l'effet des nanoparticules sur le changement de la morphologie cellulaire et la tendance à la mort cellulaire. Les mêmes tests sont envisagés afin d'identifier précisément la localisation cellulaire du stockage des nanoparticules. L'étude, par biopuce à ADN, de l'effet global des nanoparticules sur l'expression des gènes sur un modèle cellulaire humain est aussi envisagée.

Projet 5 : Développement de deux kits d'aide au diagnostic moléculaire et Criblage de molécules thérapeutiques des surdités par des Technologies haut débit.

Conception de biopuces bicolores permettant le dépistage simultané de mutations décrites dans les pays d'Afrique du Nord: Dans le cadre de développement de nouveaux kits d'aide au diagnostic moléculaire, une première puce pour le diagnostic en parallèle de 58 mutations responsables de surdité a été développée. La Validation à l'aveugle des sondes conçues a été effectuée en analysant les ADNs de 48 sourds. Pour 35 échantillons, aucune mutation n'a été trouvée. Cela a été confirmé chez deux cas par séquençage d'exomes permettant de détecter une novelle mutation dans le gène COL11A2 et d'identifier le nouveau gène DCDC2.

Durant l'année 2015, nous avons étudié la famille d'un troisième cas index. Nous avons attribué le locus du gène de la surdité à une région de 12,8 Mb sur le chromosome 5q23.2-31.1, correspondant au locus DFNB60. Par séquençage d'exome, nous avons découvert une substitution p.Cys113Tyr dans la protéine SLC22A4. Le criblage d'une cohorte de 71 familles tunisiennes atteintes de surdité a amené à découvrir la même mutation à l'état homozygote chez un enfant qui souffre de surdité profonde issu d'un mariage consanguin. SLC22A4 transporte divers composés, y compris des cations organiques, tels que la carnitine et l'ergothionéine. Par immunofluorescence, nous avons démontré que SLC22A4 est exprimé dans la strie vasculaire. Ces observations sont conformes à l'identification du transcrit du gène SLC22A4 dans la librairie de RNA-Seq purifiée à partir de culture primaire de cellules épithéliales de la strie. Enfin, l'inhibition de l'expression du gène SLC22A4 chez le poisson zèbre provoque une surdité neurosensorielle. Nous envisageons d'inclure ces mutations dans notre puce suite aux étapes de désignation de sondes et de validation.

Par ailleurs, au cours de l'année 2015 nous avons préparé une deuxième puce pour le diagnostic de la maladie de Charcot Marie Tooth (CMT). Sept PCR multiplexes amplifiant des régions mutantes, identifiées chez des familles atteintes de CMT et originaires d'Afrique du Nord, ont été optimisées. Après la mise au point de ces PCR, des oligosondes ont été choisies et imprimées sur des lames couvertes d'aldéhydes. Chaque array présente six blocs identiques de 19 oligonucléotides (Figure ci-dessous). Les tests de validation ont été effectués en utilisant les ADNs de 18 malades et n'ont montré aucune mutation. Un **brevet** national intitulé « Biopuce oligonucléotidique bicolore pour le dépistage simultané de mutations responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth en Afrique du Nord » est accepté.



LMNA cC892Ts	CX32c438dels
GDAP1cG92Aas	RAB7cG471Cs
GDAP1cC233Ts	GANc18insAs
GDAP1cG482As	GANcC43Aas
GDAP1cC581Gas	GANcT926Gs
GDAP1cG929Cs	GAN cC1447Ts
MTMR13cC2875Tas	GANcG1456Aas

Biomarqueurs génomiques et épigénomiques de la surdité liée à l'âge: Une étude de méthylome chez six femmes par séquençage haut-débita été réalisée avec la technologie RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing). En comparant les deux groupes d'échantillons malades et témoins, environ 475 gènes ont été significativement déduits comme différemment méthylés au niveau des régions régulatrices coté 5' (promoteur et/ou exons 1 et 2), avec 210 gènes hyperméthylés et 265 gènes hypo-méthylés. Pour évaluer l'effet de ces changements de méthylation sur

le niveau d'expression des gènes, une analyse transcriptomique a été effectuée en utilisant des puces à ADN. En effet, une corrélation a été faite pour ne s'intéresser qu'aux gènes différemment hyperméthylés présentant une sous-expression chez les femmes âgées comparant les malades et les témoins. Par la suite, une étude bioinformatique approfondie (expression des gènes dans la cochlée humaine, annotations fonctionnelles et interprétations biologiques) a été faite pour l'identification de biomarqueurs potentiellement impliqués dans l'atteinte auditive de la presbyacousie. Ainsi, jusqu'à ce stade d'analyses sept gènes semblent être impliqués dans des interactions de voies auditives, montrant l'effet d'hypermethylation comme un mécanisme derrière la déficience auditive liée à l'âge. Les données d'expression géniques ont été confirmées pour quatre gènes par qPCR.

Projet 6 : Développement de kits pour l'authenticité moléculaire.

Authenticité et traçabilité moléculaire de l'huile d'olive : La première action a consisté à développer un kit pour l'authentification et la traçabilité moléculaire des huiles d'olives. Après avoir optimisé le protocole d'extraction d'ADN à partir d'huile vendue en vrac ou commercialisée emballée, nous avons choisi un certain nombre de marqueurs de type STR, nous avons étudié leur pourvoir de discrimination seuls et combinés les uns aux autres et leur capacité à distinguer les huiles extraites de différents cultivars tunisiens. Un ensemble minimal de trois marqueurs qui permet de manière séquentielle et non ambigüe de distinguer l'origine variétale d'une huile monovariétale a été défini. Nous avons ensuite testé la performance de ce système de marqueurs sur des mélanges d'huiles de différentes variétés à proportion de mélange connu et ensuite sur une sélection de différentes huiles commercialisées emballées et vendues en supermarché. On a montré que des mélanges d'huiles de deux ou plusieurs variétés peuvent être détecté à condition que la proportion de l'huile la plus rare dépasse 10% du mélange. Pour ce qui est de la détection de mélanges frauduleux avec d'autres huiles, un système de marqueurs spécifiques des huiles les plus couramment utilisé en fraude (arachide, maïs, palme, tournesol) a été testé et a montrer sa capacité à détecter des fraudes à hauteur de 5% de mélange, ce qui est semblable à la performance des méthodes basées sur les analyses chimiques tout en ayant un cout plus faible. La conception de kits basés sur la PCR multiplexe pour la traçabilité et l'authenticité de l'huile d'olive est en cours.

Authenticité et sécurité des produits carnés : La composition, l'origine, les proportions des ingrédients et la qualité des aliments concernent de plus en plus le consommateur et la prise de conscience de l'impact de l'alimentation sur la santé augmente. L'identification des espèces animales qui entrent dans l'alimentation humaine ou animale fait partie intégrante de la sécurité alimentaire. Pour les industriels de l'agro-alimentaire, garantir l'authenticité des produits carnés est un facteur fondamental, non seulement pour garantir la sécurité sanitaire, mais aussi pour des raisons de santé (allergies à certains produits animaux), économiques et religieuses. Dans ce projet, nous proposons le développement d'outils moléculaires pour la spéciation qualitative et quantitative des produits carnés transformés (salami, saucisse, jambon, merguez, viande hachée, viande des plats cuisinés, kebab, kefta, viande salée, viande séchée, etc.) en visant le génome mitochondrial. Les espèces indigènes ciblées par notre projet sont les suivantes : mouton, bœuf, dromadaire, porc, lapin, chèvre, poulet, dinde, autruche, cheval, âne, chien, chat, rat et souris. Durant la première année d'activité, nous avons consolidé notre banque d'ADN en collectant plus de 400 ADN du cheptel tunisien (mouton 120, chien 114, bovin 98, cheval 28, chèvre18, poulet 15, chat 7, âne 5, lapin 4, rat 3, dinde 2, dromadaire 1). Ces échantillons seront utilisés pour identifier la spécificité de la séquence mitochondrial de chaque espèce en Tunisie par les

technologies de séquençage à haut débit de nouvelle génération (NGS). D'autre part, une analyse bioinformatique avancée nous a permis de déterminer les séquences mitochondriales les plus discriminantes qui seront la cible de notre investigation. Une première tentative de séquençage NGS incluant 9 espèces différentes a été lancée visant uniquement trois régions discriminantes. L'analyse des données, la détection des variants et l'identification de différentes populations mitochondriales par espèce sont en cours. D'autre part, plusieurs protocoles d'extraction d'acide nucléiques à partir de viande traitée (salami et jambon) ont été mis au point à fin de choisir la méthode idéale pour extraire un support d'ADN mitochondrial intact et avec le minimum d'inhibiteur de PCR. Dans ce cadre, deux protocoles développés ont été retenus en se basant sur les résultats obtenus par PCR ciblant des régions spécifiques de la séquence mitochondriale (Cytb et D-loop). L'analyse des résultats de séquençage à haut débit permettra l'établissement d'un code barre d'ADN mitochondrial spécifique de chaque espèces étudiées ; une étape indispensable avant de développer un test de dépistage moléculaire à faible, moyen et haut débit.

Identification individuelle: Sur le volet indentification individuelle nous avons optimisé les protocoles d'extraction d'ADN à partir de différentes sources et échantillons biologiques (fluides biologiques, cheveux, ongles, cadavres, ...) et étudié le pouvoir discriminatif de nouveaux marqueurs Y-STR. Nous somme ensuite passé à la conception d'un kit de PCR multiplex pour l'identification par génotypage de Y-STR combinant de nouveaux marqueurs avec ceux des kits commerciaux rendus plus fiables pour les ADN dégradés par de nouvelles amorces. Deux multiplexes ont été conçus: le premier multiplexe comporte 12-plex dont le choix est justifié par la fréquence allélique et la diversité génétique des Y-STRs. Le deuxième multiplexe est composé de 8-plex regroupant le reste des marqueurs. Nous avons réussi la mise au point du multiplexe de 10 marqueurs et nous envisageons d'ajouter les deux STRs supposés a mutation rapide pour finaliser un nouveau panel de 12 Y-STRs avec une Prouvoir de discrimination attendu de 0.96%. supérieur à celui du kit commercial (85%). Il nous reste à évaluer les conditions du mélange réactionnel pour tout type d'ADN, produire un primer Mix prêt à l'emploi et étudier les mélanges d'ADN et la tolérance aux inhibiteurs. L'amélioration du kit Y-STRs permettra de mieux préciser la conclusion d'exclusion en l'absence du père présumé (dans l'étude de filiation). Remarque: nous estimons que le faible financement sur contrat-programme, bien en dessous

(50%) de ce qui a été demandé lors de la soumission de la demande de création du laboratoire et faible relativement à la taille de celui-ci et au nombre de projets proposés a considérablement affecté l'avancement de certaines projets.

Tableau récapitulatif des activités

Articles	Brevets	Thèses	Stages	Participations	Mastères	Thèses	Conferences
		en cours	étranger	congrès	soutenue	soutenues	organisées
18*	1	14	2	10	5	2	2

*dont 3 ou le laboratoire intervient au titre de collaborateur

Liste de Publications parues en 2015

- 1) Belmabrouk S et al. 2015. Exploring proteome-wide occurrence of clusters of charged residues in Eukaryotes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 83: 1252-61
- 2) Abdelhedi R et al. 2015. Characterization of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19 polymorphisms in Tunisian, Kuwaiti and Bahraini populations. *J Genet*, 94: 765-70.

- 3) Bouhamed, H. et al. 2015. Structure space of Bayesian networks is dramatically reduced by subdividing it in sub-networks. *Journal of Computational and Applied Mathematics*. 287: 46-62.
- 4) Bouhamed H e al. 2015. Bayesian classifier structure-learning using several general algorithms. *Procedia Computer Science*. 46: 476-482.
- 5) Choura M et al. 2015. Unraveling the WRKY transcription factors network in Arabidopsis Thaliana by integrative approach. *Network Biology*, 5: 55-61
- 6) Choura M, Rebaï A. 2015. Prediction of hormone response elements in the human tyrosine kinase receptors. *Current Topics in Peptide & Protein Research*.
- 7) Triki-Fendri S et al. 2015. Paternal lineages in Libya inferred from Y-chromosome haplogroups. *American Journal of Physical Anthropology*. 157: 242-51.
- 8) Chaabane S et al. 2015. Genetic Determinants of Methotrexate Toxicity in Tunisian Patients with Rheumatoid Arthritis: A Study of Polymorphisms Involved in the MTX Metabolic Pathway. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*.
- 9) Triki-Fendri S, et al. 2015. Genetic structure of the Kuwaiti population revealed by paternal lineages. *American Journal of Human Biology*, in press.
- **10**) Kallel I et al. 2015. What a common biomarkers characterize a triple-negative profile in breast cancer? *Pathologie Biologie*, 63: 224-9
- 11) Apellániz-Ruiz M et al. 2015. High frequency and founder effect of the CYP3A4*20 loss-of-function allele in the Spanish population classifies CYP3A4 as a polymorphic enzyme. *Pharmacogenomics J.* 15: 288-92.
- **12**) Sami Mnif, Sami Aifa. 2015. Cumin (Cuminumcyminum L.) From Traditional Uses to Potentiel Biomedical Applications. *Chemistry and Biodiversity*. 12: 733-42.
- 13) Elloumi-Mseddi J et al. 2015. Effect of estradiol and clomiphene citrate on Erk activation in breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res.* 35: 202-6.
- **14**) Makki-Rmida F et al. 2015. Genetic diversity and haplotype structure of 21 Y-STRs, including nine noncore loci, in South Tunisian Population: Forensic relevance. *Electrophoresis*, 36: 2908-13.
- 15) Chakchouk I et al. 2015. NADf chip, a two-color microarray for simultaneous screening of multigene mutations associated with hearing impairment in North African Mediterranean countries. *J Mol Diagn*, 17: 155-61.
- **16**) Chakchouk I et al. 2015. Novel mutations confirm that COL11A2 is responsible for autosomal recessive non-syndromic hearing loss DFNB53. *Mol Genet Genomics*. 2015, 290: 1327-34.
- 17) Grati M et al. 2015. A missense mutation in DCDC2 causes human recessive deafness DFNB66, likely by interfering with sensory hair cell and supporting cell cilia length regulation. Hum Mol Genet, 24: 2482-91.
- **18**) Ben Ayed R et al. 2015. Molecular phylogeny to specify Zalmati and Chemlali Tatouine Tunisian olive cultivars. *Journal of New Science.*, *Agriculture and Biotechnology* 18: 689-694.

Brevets d'inventions

Biopuce oligonucleotidique bicolore pour le depistage simultané de mutations responsables de la maladie de CharcoMarie-Tooth en Afrique du Nord. Inventeurs : Imen Chakchouk, Mariem Ben said, Fida Jbeli, Hassen Hadj Kacem, Saber Masmoudi. TN2015/0585 (INNORPI)

Thèses de doctorat soutenues en 2015

Jihéne Elloumi Mseddi, sujet : Etude de l'expression du récepteur du facteur de croissance épidermique(EGFR) et de l'inhibition de sa signation, Diplôme de thése de doctorat en Génie Biologique à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax. Soutenue le 07 Mars 2015.

Rania Abdelhedi –Jallouli, sujet : Role des polymorphismes des gènes des cytochromes P450 et des cibles thérapeutiques dans la réponce aux traitements dans les maladies coronaires. Faculté des Sciences de Sfax. Soutenue le 27/06/2015.

Kalle Rihab, Etude génomique et fonctionnelle des gènes SLC26A4 et FOXE1 impliqués dans des pathologies thyroïdiennes, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenue 29 Juillet 2015.

Mastères de recherche soutenus en 2015

Raafa Trabelsi. Atténuation de l'expression du gène SLC26A4 par la technique des siRNAs.

Meryam Chelly. Analyse d'exomes chez deux familles Tunisiennes présentant des troubles de communication.

Soulef Sayhi. Etude du profil de méthylation de gènes impliqués dans l'immunité antitumorale chez les femmes jeunes ayant un cancer du sein.

Nidhal Dhibi. Etude in vitro de la toxicité de deux nanoparticules de la famille des lanthanides.

Organisations des manifestations scientifiques en 2015

Second International Conference on Engineering Sciences in Biology and Medicine ESBM015, 1-3 Mai 2015. Monastir, Tunisie.

Financement:

Sur contrat-programme: 112,500 DT

Coopération internationale:

Projet TWAS. SLC26A4 gene silencing for a potential siRNA-based therapy of respiratory inflammation. Responsable: Pr Hassen Hadj Kacem. Budget: 12000 \$

Projet ICGEB Microarray-based System for the Detection of North African Mutations. Responsable: Pr Saber Masmoudi. Budget: 13.000 \$

Projet TWAS Assessment of antioxidant status of patients with cardiovascular diseases and relationship with diet. Responsible: Dr Najla Kharrat; Budget: 3.500 \$

US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches (UVRR)

وحدة مختصة: تثمين نتائج البحث

Responsable : Mr.Ilem HASSAIRI

Email: <u>ilem.hassairi@cbs.rnrt.tn</u>

MEMBRES DE L'EQUIPE

Mr. Ilem HASSAIRI : Ingénieur général/ 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 Principal
 Mr. Kamel M'RAD : Assistant de labo Principal

Mr. Faiçal BOUKHILI : Technicien Mr. Salah BOUAZIZI : Technicien

Mr. Haitham MILADI: Agent technique

Mr. Mohamed AMRI : Ouvrier

OBJECTIF GENERAL

L'unité de valorisation a pour objectifs de développer, stimuler, accompagner et valoriser les travaux et résultats de la recherche scientifique ainsi que l'innovation au sein des entreprises, tout en renforçant les liens entre ces dernières et le monde de la recherche scientifique.

L'objectif global vise à contribuer au développement durable pour la promotion de la recherche et d'encourager le monde socio-économique, en apportant un soutien à travers le transfert de savoir depuis le laboratoire vers le secteur industriel et l'accompagnement technologique pour l'exploitation et la création de nouveaux produits.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Extrapolation et production à l'échelle pilote de biomolécules actives et autres.
- Intégration de procédés innovants basés sur la technologie membranaire.
- Utilisation des enzymes dans les procédés d'extraction et de transformation.
- Valorisation technologique et transfert des antioxydants dans des produits alimentaires
- Contribution au développement des activités de recherches des différents laboratoires du CBS.
- Extrapolation à l'échelle pilote, des expérimentations conduites à l'échelle laboratoire.

ACTIVITES DE L'UNITE UVRR

Les activités de l'Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR) sont principalement subdivisées en trois:

1^{er} activité : Assistance et extrapolation à l'échelle pilote des projets de recherche élaborés par les différents laboratoires du CBS.

2^{ème} activité: Valorisation technologique et transfert des antioxydants dans des produits alimentaires.

3^{ème} activité : Développement et transfert de nouveaux procédés et bioproduits destinés à l'amélioration des produits de figue de barbarie.

Activité 1 : Développement et extrapolation des résultats de la recherche

Les principaux projets de recherche développés au sein de l'UVRR durant l'année 2015 sont les suivants :

I.1. Extrapolation d'un procédé de Fabrication de sirop de Fructo-Tagatose à partir du Lactosérum.

I.2. Développement d'un procédé économique de production de cellules recombinantes d'*Echerichia coli* exprimant les deux activités enzymatiques: la glucose isomérase (GI) et la L-arabinose isomérase (L-AI) et ce à partir du Lactosérum.

Cette souche a été isolée et modifiées génétiquement au sein du laboratoire de Microorganismes Microbienne et d'Ingénierie des enzymes (LMBIE) du CBS.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration étroite avec le Laboratoire de Microorganismes Microbienne et d'Ingénierie des enzymes (LMBIE) du CBS.

Dans la suite du document un résumé de ces travaux de recherche.

I.1. Extrapolation d'un procédé de fabrication de sirop de Fructo-Tagatose à partir de lactosérum.

Les édulcorants sont de plus en plus utilisés dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques. Dans ce contexte, plusieurs recherches sont menées au sein du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS portant sur " La production de sirop de Fructo-Tagatose chez une souche recombinante *d'Echerchia coli*". Cette souche est ensuite transférée à l'UVRR pour la suite de l'étude.

Le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules 'LMBIE' a développé à l'échelle laboratoire un procédé de production d'un sirop riche en D-Fructose et en D-tagatose à partir de lactosérum. Le glucose isomérase (GI) et la L-arabinose isomérase (L-AI) sont les enzymes utilisées dans la bioconversion du fructose et du D-tagatose, respectivement. Ces deux enzymes sont très bien étudiées au Laboratoire (LMBIE) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS). Le procédé de fabrication d'un sirop de D-fructo-tagatose à partir du lactosérum nécessitera des étapes de purification du lactosérum de bioconversion du lactose. Toutes ces étapes sont bien étudiées à l'heure actuelle à l'échelle laboratoire et sont optimisées et extrapolées à l'échelle pilote dans le cadre de ce programme. Le but de ce travail consiste à la mise au point d'un procédé fiable et reproductible de purification du lactosérum.

Le lactosérum est très riche en protéines, en minéraux (8 à 20 % de la matière sèche) et en lipides. L'étape de la transformation du lactose du lactosérun nécessite des étapes d'élimination non seulement les lipides et les protéines mais aussi les minéraux qui peut géner la phase de bioconversion par les cellules d'E.coli en Fructo-Tagatose. Il est

Un procédé basé sur la technologie membranaire (microfiltration couplé à l'ultrafiltration) a montré son efficacité pour l'élimination des lipides et des protéines du lactosérum. Les conditions opératoires du procédé (MF, UF) sont optimisées et la qualité du produit est analysée. Les bilans massiques établis montrent que les fractions de protéines retenues par les membranes d'UF sont fortes et dépassent les 97 %. Le couplage des procédés d'UF en aval à la MF, en utilisant une membrane de seuil de coupure de 8 kDa conduit à une grande efficacité d'élimination de la majorité de la fraction protéiques (environ 90%). La totalité des protéines a été récupérée dans le retentât, ce qui prouve que les protéines du lactosérum possèdent un poids moléculaire supérieur à 8 kDa.

Afin de pouvoir éliminer les minéraux de la solution du lactosérum déprotéiné, deux résines échangeuses d'ions, criblé auparavant au labo LMBIE, ont été testées à grande échelle dans des colonnes en verre de hauteur de 1m 20 et de diamètre intérieur de 4 cm. Pour ce faire, L'influence de la température, de la concentration en lactose et du débit d'alimentation sont étudiées. L'ensemble des résultats obtenus montrent que les fractions de minéraux retenues par les résines sont fortes et dépassent les 90 %. Par ailleurs, la concentration du lactose dans la solution du lactosérum traité reste constante.

I.2. Développement d'un procédé économique de production de cellules recombinantes d'*Echerichia coli* exprimant les deux activités enzymatiques glucose isomérase (GI) et L-arabinose isomérase (L-AI) à base de lactosérum

Le procédé de fabrication d'un sirop de D-fructo-tagatose à partir du lactosérum nécessite des étapes de production des cellules recombinantes exprimant les deux activités enzymatiques à savoir le GI et la L-AI.

Pour ce faire, les conditions de culture en batch et de production des cellules recombinantes (la GISK/F53L G219D et la L-AI) exprimant les deux activités enzymatiques sont étudiées et optimisées dans des fermenteurs de capacités croissantes allant de 3 L à 7 L en utilisant des milieux moins onéreux.

Ainsi, la technique de fermentation semi-continue a été appliquée afin de pouvoir produire une concentration élevée en biomasses avec un bon rendement et une bonne productivité.

En perspectives, les cellules produites seront immobilisées et la production en continu des sucres convertis sera optimisée dans des colonnes de différentes capacités.

En effet, à l'UVRR, un programme de recherche-développement sur les procédés de fermentation et de fabrication à l'échelle pilote de sirop de Fructo-Tagatose par la souche *d'Echerchia coli* nous a été confié pour son développement.

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'extrapoler la production de cellules recombinantes d'*Echerichia coli* exprimant les deux activités enzymatiques glucose isomérase (GI) et L-arabinose isomérase (L-AI) à partir du lactosérum 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 cellules à partir du lactosérum. 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 cellules recombinantes à partir du lactosérum a nécessité une optimisation des étapes de séparation et de concentration du lactosérum. Ainsi, un traitement physique basé sur les techniques membranaires est utilisé. La séparation et la concentration du lactosérum ont été réalisées par microfiltration tangentielle et par rotavap respectivement, respectivement. Les conditions opératoires de ces opérations unitaires sont optimisées. Les conditions de culture et de la production des cellules recombinantes par fermentation dans un fermenteur de capacité 7 litres en batch et en batch – alimenté sont optimisées et la faisabilité technologique de ce projet est étudiée.

I.2.1. Clarification-délipidation du lactosérum

Le lactosérum est un co-produit de l'industrie laitière. Il contient environ 50 % des nutriments du lait (protéines solubles, lactose, vitamines et minéraux). L'exploitation de ce co-produit en vue de sa valorisation sous forme de milieu de culture nécessite une étape de clarification et de délipidation. Le prétraitement du lactosérum est nécessaire car il contient des résidus de la fabrication fromagère et caséinière (fines de caillé, lipides, etc.).

Des travaux antérieurs, réalisés auparavant en erlenmeyers à l'UVRR, ont montré que, l'utilisation d'un milieu de culture à base du lactosérum brut comme seule source de carbone et d'énergie à limiter la croissance et la production des enzymes (glucose isomérase (GI) et L-arabinose isomérase (L-AI)) chez la souche recombinante d'E-coli testée par contre l'utilisation d'un milieu de culture à base du lactosérum délipidé a stimulé la croissance et la production des enzymes chez la souche testée.

Un procédé basé sur la technologie membranaire (microfiltration) a montré son efficacité pour l'élimination des lipides du lactosérum, ainsi les conditions opératoires sont optimisées. A la lumière des résultats obtenus, nous avons pu constater qu'en termes de rendement, l'augmentation de la vitesse de circulation de 3 à 5 m/s réduit le taux des lipides (de 90% à

37%). Toutefois, l'augmentation de la pression transmembranaire (PTM) à des valeurs supérieures à 2,2 bars réduit le taux d'élimination des lipides de l'ordre de 20%.

Par ailleurs, il est à noter que les meilleurs rendements de délipidation sont obtenus à une vitesse de circulation égale à 3 m/s et à une PTM égale à 1,5 bar en utilisant une membrane minérale de diamètre de pores égale à 0,1 µm.

Après des études d'optimisation réalisées sur la détermination des conditions opératoires optimales des procédés membranaires (microfiltration 'MF'), les bilans massiques établis montrent que les fractions de protéines retenues par les membranes de MF sont faibles et ne dépassent pas les 7 %.

I.2.2. Extrapolation de la production en batch à l'échelle fermenteur de capacité 7 litres

I.2.2.1. Effet de la concentration du lactosérum sur la production des cellules recombinantes d'E.coli PAD33 exprimant les deux activités enzymatiques à savoir le GI et la L-AI.

Afin d'optimiser, dans la formulation du milieu de culture, la concentration du lactosérum utilisé comme seule source d'énergie pour la croissance et la production des enzymes intracellulaires chez les souches *d'E.coli*, différentes concentrations en lactosérum ont été testées (10, 20 et 26 g/L). Les conditions de culture retenues pour tous les essais sont une température de 30°C, une vitesse d'agitation égale 700 trs/min et une aération de l'ordre de 1vvm.

A la lumière des résultats obtenus (Tableau 1), nous constatons qu'en termes d'activité spécifique, l'augmentation de la concentration du lactosérum de 10 g/L à 26 g/L n'améliore pas ce paramètre (7127U/g pour une concentration du lactosérum de 10 g/L contre 6426 U/g pour une concentration du lactosérum de 26 g/L).

Toutefois, l'utilisation du lactosérum à une concentration de l'ordre de 26 g/L réduit la croissance de la souche testée (de 7.9 g/L à 7.5 g/L) ainsi que la productivité qui diminue d'une valeur de 0.98 à une valeur de 0.93g/L/h.

Ces travaux ont permis de démontrer qu'un milieu de culture 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 7,9 g/L. Par ailleurs, sous une concentration supérieure, la production d'enzymes obtenue a été inférieure à 43,6 u/mg pour une concentration en sucre de 20 g/L et à 48,2 u/mg pour une concentration en sucre de 26 g/L. Par contre, elle a été supérieure lors de l'utilisation d'un milieu 2LB (de 45,2 u/mg). En conclusion, la souche testée a montré son aptitude à fermenter directement le lactosérum. De plus il est à signaler que la concentration initiale de lactosérum avait un effet significatif sur la croissance et la productivité chez la souche utilisée. Pour la production des cellules d'E.coli en utilisant le lactosérum, on a montré que seulement l'ajout dans le milieu de culture d'une source d'azote complémentaire (essentiellement l'extrait de levures) est nécessaire pour le bon déroulement de la fermentation.

Tableau 1: Effet de la variation de la concentration du lactosérum sur les paramètres cinétiques de la production des cellules recombinantes chez la souche recombinante *d'E.coli* PAD33

Concentration du lactose (g/L)	10	20	26	
Activité enzymatique (U/mg)	56.3	43.6	48.2	
Biomasse (g/L)	7.9	8.2	7.5	
Activité spécifique (U/g)	7127	5317	6426	
Productivité (g/L.h)	0.98	0.97	0.93	

I.2.2.2. Effet de l'aération

Une étude d'optimisation des conditions d'aération (assurée par l'agitation et le débit d'air) est ainsi réalisée. Il est à noter que l'étape de l'extrapolation de la production des cellules recombinantes à l'échelle fermenteur (fermentation aérobic) nécessite surtout la mise au point du couple agitation/aération afin de pouvoir maximiser le transfert d'O₂ dans le milieu réactionnel et fournir le besoin énergétique optimal pour la croissance de la souche et la production du métabolite recherché.

L'analyse des résultats obtenus montre que les meilleures productions de cellules *d'E.Coli* et les meilleures productivités sont obtenus sous une vitesse d'agitation égale à 700 tr/min et un débit d'air de 1 vvm.

Par ailleurs, sous ces conditions optimales, la production des cellules recombinantes *d'E.Coli* et la productivité obtenues sont respectivement de l'ordre de 7,9 g/L et de 0,98g/L/h. Les paramètres cinétiques de la souche testée ont été déterminés (Rendement 70%, μmax 0,3h⁻¹) Une étude approfondie des éléments de base qui sont le transfert d'oxygène et le transfert de la matière seront étudiés en perspectives.

I.2.2.3. Etude en batch alimenté

Afin de pouvoir obtenir des cultures à haute densité cellulaire, les cellules recombinantes *d'E.Coli* sont produites en mode semi-continu (fed-batch) sur un milieu à base de lactosérum dans un fermenteur de volume total 7 litres. Une solution concentrée de milieu de culture est introduite dans le bioréacteur afin de maintenir la concentration du lactose constante au cours du temps. Au cours de la fermentation, des échantillons sont prélevés toutes les heures et traités immédiatement pour la détermination des concentrations du lactose et des cellules *d'E.coli*. En effet, trois taux d'alimentation en lactose (1,5; 2 et 4 g/L.h) ont été testés. Après 8 heures d'alimentation continue sous un taux de 2 g/L.h, la concentration cellulaire obtenue est de 20,8 g/L, elle est largement supérieure à celle obtenue en batch simple qui est de seulement 7,9. Parallèlement, et pour des taux d'alimentations de 1 et de 4 g/L, les productions en biomasses sont respectivement de 11,2 et de 14,4 g/L/h. Les études de production de biomasse en batch alimenté à montré que l'application d'un taux d'alimentation en lactosérum élevé (supérieur à 2 g/L) provoque la répression de la croissance cellulaire. La fermentation fed batch du lactosérum a permis alors d'avoir une concentration plus élevée de biomasse de l'ordre de 20,8 g/L et des valeurs de rendement et de productivité plus grandes comparativement au mode de fermentation batch.

I.2.2.4. Production d'enzymes en grande quantités

La production de quantités importantes de cellules recombinantes en fermenteur de capacité totale 100 litres est réalisée et formulée afin de pouvoir les tester principalement dans la fabrication de sirop de Fructo-Tagatose.

Un procédé basé sur la technologie membranaire (microfiltration) couplé en aval au fermenteur a montré son efficacité pour la récupération des cellules du moût de fermentation.

Activité 2 : Valorisation technologique et transfert des antioxydants dans des produits alimentaires

Il y a de plus en plus d'intérêt à l'utilisation des antioxydants naturels comme des composants bioactifs dans les aliments. Le Laboratoire LBPE a développé à petite échelle un procédé de production des antioxydants à partir des feuilles d'olives et autres. Le procédé d'extraction des antioxydants à partir de plantes végétales nécessite des étapes d'extraction, de concentration et de purification. Toutes les étapes de production des antioxydants sont bien étudiées à l'heure actuelle à l'échelle laboratoire.

Au niveau de l'unité de Valorisation des Résultats de la Recherche du Centre de Biotechnologie de Sfax, un programme de recherche-développement sur la valorisation technologique et le transfert des antioxydants dans des produits alimentaires nous a été confié pour son développement à l'échelle pilote visant la mise au point d'un procédé d'extraction des antioxydants à partir de plantes végétales. Ce procédé nécessite des étapes d'extraction, de séparation par l'application de la technologie membranaire et de concentration sous vide par rotavap. Toutes les opérations unitaires d'extraction, de séparation et de purification sont étudiées à l'heure actuelle à l'échelle pilote. Des études supplémentaires seront nécessaires pour maximiser le rendement et la qualité de l'extrait et produire une substance qui répond aux normes de son utilisation au niveau industriel. Les antioxydants produits à grandes échelle seront par la suite transférés à la Société GIPA, en tant que partenaire au projet et est intéressée par l'utilisation de Biomolécules actives élaborés au CBS, essentiellement 'les antioxydants naturels' dans de produits riches en graisses et lipides sera restée a pour objectif de retarder les réactions d'oxydation, d'empêcher les contaminations par des bactéries et de retarder le vieillissement des produits. Les résultats de cette étude restent confidentiels.

Activité 3 Développement d'un procédé basé sur la technologie membranaire pour la clarification, du jus de cactus et mise au point d'un procédé d'extraction et de valorisation des écorces de figue de barbarie et de farine de raquettes

Dans le cadre du projet Européen CINEA 'Premier forum R21 de la recherche à l'industrie' visant la valorisation des résultats de la recherche (bioproduits ou bioprocédés à haute valeur ajoutée) pour le développement et la promotion des industries tunisiennes en biotechnologie, l'Unité UVRR a proposé de travailler sur un projet intitulé : 'Développement et transfert de nouveaux bioprocédés et /ou bioproduits aux partenaires socio-économiques'.

Deux partenaires industriels tunisiens font partie au dit projet et ont été mobilisés pour l'application de produits et/ou procédés à valeurs ajoutées élaborés au sein de l'UVRR dans leurs procédés de productions. La Société NOPAL, en tant que 1^{er} partenaire est vivement intéressée par le transfert des bioprocédés fiables et reproductibles basés sur la technologie membranaire d'une part et l'application des enzymes permettant l'amélioration ou l'élaboration de nouveaux produits dans la gamme de ses articles produits, d'autre part.

III.1. Développement d'un procédé basé sur la technologie membranaire pour la clarification, du jus de cactus

Le traitement du fruit de figue de barbarie par les enzymes tels que les pectinases, les cellulases etc., conduit à des produits très divers selon les conditions d'hydrolyse et la nature des enzymes. Ainsi, un procédé de transformation du fruit de figue de barbarie, basé sur la technologie membranaire associée aux enzymes, pour la clarification et l'élaboration des nouveaux produits sera développé. En effet, les procédés membranaires associés à la bioconversion enzymatique constituent une solution pour transformer la totalité de la biomasse (fruit) en sources énergétiques, offrant des possibilités de production d'un bioproduit complet riche en molécules à haute valeur (vitamines, arômes, polyphénols, etc.). Par ailleurs, les techniques de clarification membranaire permettent de conserver les éléments nutritifs essentiels du fruit et préservent alors la qualité et la stabilité du produit. Les essais préliminaires de clarification du jus brut de la figue de barbarie sont réalisés à l'UVRR sous une température inférieure à 37°C en utilisant une membrane céramique. Un flux de filtration faible et stabilisé à 25l/h.m² a été obtenu après 70 minutes de filtration. Le flux de filtration a été étudié en fonction de la concentration de degré brix (12-24°brix) et de la température du jus (25 à 40°C). La clarification s'est traduite par l'obtention d'un jus clair, translucide et d'une couleur jaunâtre. Il est possible d'augmenter le flux

de filtration significativement et la séparation par l'ajout des réactions de bioconversion enzymatiques (les pectinases, les cellulases etc.). L'intégration de ces opérations en amont de l'étape de la séparation membranaire peut être imposée soit par le système et les conditions opératoires de la séparation membranaire (colmatage par les fibres ou/et la matière colloïdales, FCV faible,...) soit par la qualité du produit. En perspectives, les techniques de dé colmatage des membranes seront étudiées et la possibilité d'associés la bioconversion enzymatique aux procédés membranaires sera développée. L'efficacité du procédé de séparation sera évaluée par les bilans matière et énergétique, la stabilité et la qualité du produit.

III.2. Mise au point d'un procédé d'extraction et de valorisation des écorces de figue de barbarie et de farine de raquettes : production de polyphénols et des polysaccharides

Les raquettes et écorces de figue de barbarie sont reconnues pour leur richesse en fibres, en polysaccharides et en polyphénols qui peuvent le rendre valorisable. Dans ce projet, nous avons proposé de pousser la valorisation vers la production des bioproduits à haute valeur ajoutée tels que les polysaccharides et les polyphénols par application des procédés de séparation et d'extraction économique. L'extraction de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de la matière végétale, notamment les polyphénols, suscitent actuellement beaucoup d'intérêt en raison de leur pouvoir antioxydant et anti-radicalaire élevés. La fraction phénolique peut varier en forte proportion et dépend, en plus de l'origine de la matière première, des conditions de culture, de stockage et autres. La solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé et par les conditions de la technique d'extraction.

Certains coproduits de l'industrie NOPAL (écorces, farine de raquettes) s'avèrent des substrats prometteurs pour la production des biomolécules à haute valeur ajoutées et nécessitent alors une valorisation. Dans ce contexte, nous avons poussé la valorisation des écorces de figue de barbarie vers la production de polyphénols et les farines de raquettes vers la production de polysaccharides et ceci pour une éventuelle future application agroalimentaire et/ou pharmaceutique.

En général, les paramètres répertoriés qui influent sur le rendement de l'extraction des polyphénols sont : le temps, la nature du solvant et le rapport matière végétale / masse du solvant. Dans notre étude, les effets de trois paramètres à savoir : la température, la nature du solvant et le temps, sur le rendement d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes sont étudiés par le biais d'un plan composite à trois facteurs et à trois niveaux. L'objectif principal de ce travail est le criblage des solvants polaires montrant la capacité au produit d'intérêt et l'optimisation des paramètres qui influent sur l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes. Pour ce faire, trois solvants ont été testés à savoir : l'eau, l'éthanol et le mélange Eau/Ethanol. Le domaine expérimental défini lors de notre étude est présenté dans le tableau 2.

Tableau 2 : Domaine expérimental défini relatif à l'extraction des polyphynols à partir d'écorces de figue de barbarie.

Variables	Unité	Centre	Pas de variation
Solvant	-	-	-
Température	$^{\circ}\mathrm{C}$	37	7
temps	h	14	10

L'analyse des résultats obtenus et récapitulés dans le tableau 3 de l'étude de l'effet de la variation de la nature du solvant sur les taux d'extractions des polyphénols et des flavonoïdes montre que d'une part, le taux d'extraction des polyphénols varie entre 4,29 mg/g (Ethanol) et 20,9 mg/g (Eau), et d'autre part, la concentration des flavonoïdes varie entre 3mg/g (Ethanol) et 4,12mg/g (Eau) et ce selon la nature du solvant testé.

Enfin, le rapport des concentrations des polyphénols/flavonoides varie entre 1,4 (Ethanol) et 5,07 (Eau).

Par ailleurs, il est a noter que les effets de la variation de la température ainsi que du temps d'incubation sont non significatifs sur les taux d'extraction. Alors que la variation de la nature du solvant montre un effet significatif sur les taux d'extraction des polyphénols ainsi que sur les flavonoides.

L'analyse des réponses obtenue de la variation de la nature du solvant montre que les meilleurs rendements d'extractions des polyphénols sont obtenus avec l'eau.

Tableau 3 : Effet de la variation de la nature du solvant sur les taux d'extractions des polyphénols et des flavonoïdes

Nature de solvant	Eau	Ethanol	Eau/Ethanol
Concentration des polypénols (mg/g)	20.9	4.29	17.49
Concentration des flavoinoites (mg/g)	4.12	3.05	3.78
Rapport (polyphénol/flavonoide)	5.07	1.4	4.62

Les extraits obtenus sont analysés par les techniques chromatographiques essentiellement la chromatographie liquide à haute performance. Les résultats obtenus par la chromatographie liquide à haute performance ont montré que l'utilisation d'autres techniques s'avère nécessaire pour l'identification des biomolécules dans l'extrait.

L'extraction des polysaccharides des raquettes en utilisant de l'éthanol et de l'acétone a permis d'obtenir un mucilage jaune claire, similaire à d'autres polysaccharides commercialisés et utilisés dans l'industrie alimentaire. Notons bien que nous avons obtenu un rendement d'extraction faible de 10% de la masse de poudre de cladode sèche. Néanmoins, selon la littérature, la teneur en mucilage de certaines variétés d'*Opuntia* sp. est l'ordre de 18 à 20% de Les essais d'optimisation et de purification sont en cours de réalisation.

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 laboratoires du CBS et autres dans la réalisation d'expériences de fermentation, de séparation et d'essais. Citons par exemple :

- Séchage par lyophilisation des solutions protéiques, enzymatiques et de microorganismes.
- Concentration par la technique d'évaporation sous vide.
- Application des procédés membranaire à savoir la MF et l'UF pour la séparation et la purification de biomasse et des biomolécules et autres.
- Accomplissement des expériences de fermentation 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 11 fermentations en batch et en batch alimenté dans des fermenteurs de volumes croissants de 7 L, 20 L et 100 l pour la culture des microorganismes fongiques et la production de leurs métabolites (cellulases, xylanases, pectinases et autres) et ceci pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse du CBS.
- 2) Accomplissement des cultures de micro-algues en batch et en continue dans des photoréacteurs de capacité totale 15 L et ce pour le compte du laboratoire des procédés environnementaux.
- 3) Réalisation de 13 fermentations en batch dans des fermenteurs de volumes croissants de 20 L et 100 L pour la culture des souches de *Bacillus theringensis* et la production des

- Biopesticides. Ces fermentations ont été réalisées pour le compte de l'unité de Biopesticides du CBS.
- 4) Accomplissement de 7 fermentations pour la production de biomolécules à activité antifongique ou antibactérienne dans un fermenteur de capacité totale 5 L et 20l. Cette production a été réalisée pour le compte du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS (tableau4).
- 5) Réalisation de 7 fermentations pour la production des protéases dans des fermenteurs de capacité croissantes 20 litres et 100 litres. Ces fermentations ont été réalisées pour le compte de l'unité du Laboratoire de Microorganismes Microbienne et d'Ingénierie des enzymes (LMBIE) (tableau4).
- 6) Réalisation de 21 fermentations pour la production des enzymes (β-glu) dans des fermenteurs de capacité croissantes 20l. Ces fermentations ont été réalisées pour le compte de l'unité du Laboratoire des bioprocédés environnementaux du CBS (tableau4)
- 7) Application des procédés membranaire 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 du CBS.
- 8) Concentration d'une centaine de litres des solutions (jus enzymatiques, biomolécules etc.) par la technique d'évaporation sous vide. Cette opération a été réalisée pour le compte du Laboratoire de Microorganismes Microbienne et d'Ingénierie des enzymes et pour le Laboratoire des procédés environnementaux du CBS.
- 9) Séchage par lyophilisation des solutions protéiques, enzymatiques et de micro-organismes. Cette opération a été réalisée pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse, pour le laboratoire des bioprocédés environnementaux et pour le laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS et autres.
- 10) Broyage (broyeur mécanique, mixeur) de la cellulose, du maïs, et des produits pâteux. Cette opération a été réalisée pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse et de laboratoire de biopesticide du CBS.
- 11) Stérilisation par autoclavage des milieux de cultures, des solutions préparées et du matériel destiné à être utilisé stérilement. Ces services sont offerts aux différents laboratoires et unités du CBS.
- 12) 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 ont été réalisées pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse, du laboratoire des procédés environnementaux, du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS et du Laboratoire de Microorganismes Microbienne et d'Ingénierie des enzymes.

Laboratoires	Nombre de jours d'incubation	Volume total (L)	Nombre de fermentation
LBMIE	21	186	7
LBPE	20	15	2.
LMB	44	27	7
LBpest	28	353	13
LVBPPE	88	200	11

Tableau 4: Nombre total de fermentation, volumes totaux préparés et la durée total d'incubation réalisées au l'an 2015 pour le compte des laboratoires du CBS

Service d'Analyse

Responsable : Pr.Hafeth Belghith

Email: hafeth.belghith@cbs.rnrt.tn

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 : Technicienne
 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 KnowerPréparative ; 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 une QPCR, Une électrophorèse automatisée et un lecteur de plaque spectro-photométrique et fluorometrique

INVENTAIRE DES ANALYSES DE L'ANNÉE 2015

Des analyses effectuées par les chercheurs des différents laboratoires

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

	GC/MS	LC/MS/MS	HPLC Agilent 1200	FPLC
LBPE	91	2	1	
LBME	7	5	113	159
LBP(Biopesticides)	23	6	38	
LEMP		4	145	
LBMIE	6	-		40
LPAP				
U. I. B	4			
Externes	37	6	39	
Total	168	27	336	199

Tableau 1 : analyses effectués par le Service Analyse

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.

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: BigDyeTerminator version 3.1 (AppliedBiosystems).

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

Séquenceur 4 capillaires

Labo	Nb séquences	N Bonnes séquences
LPCMC SABER	376	335
LMB MELLOULI	97	52
LBMIB SAMIR	45	14
LPAP BRINI	82	56
LBPE	127	109
LBPESTI	57	44
LB ME	222	103
TOTAL	1006	703

Tableau 2: analyses effectués par le Service de Séquençage

<u>Séquençage d'ADN Génomique effectué par les chercheurs du CBS par le séquenceur</u> Haut débit

Les travaux effectués sont résumés dans le tableau3

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

Tableau 3: analyses effectués par le Service de Séquençage

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.