MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

RAPPORT D'ACTIVITES

DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX

ANNEE 2016

RA / CBS. 2016

TABLE DES MATIERES

1- Introduction 2

2- Présentation générale du CBS 3

3- Effectif du CBS 4

4- Liste des Enseignants Chercheurs / Ingénieurs du CBS 4

5- Membres du Conseil Scientifique 6

6- Budget du CBS 7

7- Equipements lourds du CBS 7

8- Service maintenance 8

9- Coopération Internationale 8

10- Ouverture sur l'environnement 9

11- Production Scientifique 13

12- Unité d'Information et de Documentation Scientifique 13

13- Journées scientifiques 14

Présentation des Laboratoires de recherhe, Unités et services communs du CBS 15

- LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) 16
- LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME) 30
- LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB) 50
- LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes (LBAP) 61
- LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB) 71
- LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) 83
- LR15CBS07 : Laboratoire de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire (LPCMC) 94
- US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches (UVRR) 109
- Service Analyse 126

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. 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'adaptation 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.

En cours de 2016, la Direction Générale du CBS s'est engagée à mettre en place **un système de management de la qualité selon la norme ISO 9001/2015** dans le domaine des « Activités de Recherche & Développement et les activités de Valorisation des Résultats de Recherche & le Transfert de Technologie ». Un comité de pilotage qualité a été créé, composé par des représentants des structures de recherche et des structures d'appui du Centre pour suivre le projet qualité. Des réunions périodiques du comité ont été réalisées afin de choisir le référentiel de la

norme de certification d'une part, et d'élaborer un cahier des charges pour l'assistance et la mise en place du système management de la qualité au CBS, d'autre part.

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 2016:

Durant l'année 2016, un Conseil Scientifique Elargi a eu lieu les 1er et 2 Novembre 2016 à la Direction Generale du Centre pour discuter des moyens et mécanismes de cooperation dans le domaine de la valorisation des projets de recherche et du transfert de technologie (TT). Ce conseil a été notamment honoré, lors de la 1ère journée par la présence de Monsieur le Secrétaire d'Etat à la Recherche Scientifique, Mr Khalil Amiri. Cette journée a enregistré aussi la participation de plusieurs partenaires stratégiques nationaux et internationaux du CBS dont principalement des représentants du milieu socio-econornique (ANGED, GCT, MEDIS , CTAB, CNCC, SNCPA) et du mileu académique (IPT) ainsi que des invités étrangers représentant des organismes internationaux avec qui le CBS entretient des collaborations de longues dates (IRD et IFT) et deux représentants de Toulouse White Biotechnology (TWB), un accélérateur de développement des biotechnologies industrielles. A l'issue des diverses discussions menées lors de ces 2 journées, plusieurs recommandations ont été capitalisées afin de booster la valorisation économique des résultats de la recherche au CBS dont notamment :

- Former un écosystème de TT pour augmenter la rentabilité econornique des projets
- Prévoir le recrutement de 1 à 2 personnes issues de I'industrie pour faire I'interface entre les chercheurs et le monde industriet et dynamiser la cellule de transfert
- Renforcer la collaboration avec TWB notamment par la soumission du projet Teaming afin d'atteindre l'execellence
- Diminuer le nombre de projets de recherche traités au CBS au profit de la valorisation économique.
- Penser à impliquer la direction Generale de la Valorisation des Resultats de Recherche Scientifique dans la validation économique et de facon générale dans le transfert
- Prévoir l'évaluation des chercheurs (Indicateurs académiques et transfert de technologie)
- Organiser des séminaires hebdomadaires au CBS par les chercheurs
- Organiser une demi-journée portant sur les mécanisrnes de financement des projets de valorisation (PIRD, PNRI, VRR, PRF ...) avec I'animation d'un DG (ou représentant) du ministère de I'industrie.
- Travailler sur la communication par l'organisation des journées portes ouvertes thématiques
- Organiser des réunions avec les centres techniques.
- Penser à la protection du materiel biologique et du savoir-faire avant industrialisation

Ce rapport d'activités se rapporte aux activités des différentes structures de recherche du CBS durant l'année 2016 (la 2ème 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 LBP

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	2016
Enseignants Chercheurs	52
Corps Technique	59
Administratifs + ouvriers	37
Effectif Total	148

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
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 de conférences
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
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
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
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 : **30** techniciens; **01** Préparateur et **07** agents techniques

5) Membres du Conseil Scientifique

- Sami Sayadi — Directeur Général du CBS,
- Abdallah choura — Secrétaire général et rapporteur
- Ali Gargouri — Directeur de laboratoire, Membre
- Faical Brini — Directeur de laboratoire, Membre
- Slim Tounsi — Directeur de laboratoire, Membre
- Lotfi Mellouli — Directeur de laboratoire, Membre
- Samir Bejar — Directeur de laboratoire, Membre
- Ahmed Rebai — Directeur de laboratoire, Membre
- Ilem Hsairi — Directeur Unité Spécialisée, Membre
- Mohamed Chamkha — 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
- Riadh Ben Marzouk — Représentant des ingénieurs

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 :

Budget Provenant du Ministère en DT	**Titre I: 525.000,000**
	Titre II: 800.000,000
	Equipement scientifique: 80.000,000
	Equipement administratif:20.000,000
Secteur Economique National et International en DT	**78.226,500**
Coopération Internationale: **1/Projets Multilatéraux (*)** **2/Organismes internationaux : IFS et TWAS** **3/ Projets bilatéraux** (**)	 **75.000,000 DT** **145.000,000 DT**
Coopération Internationale (Total)	**220.000,000**
Total ressources (secteur économique et coopération internationale)	**298.226,500 DT**

(*) Un projet européen CINEA FP7-INCO-2013-9; Un projet Arimnet 2 dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed et un projet LMI COSYS-Med sous tutelle de l'IRD.

(**) 4 Projets PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française ; 3 projets dans le cadre de la coopération Tuniso-Allemande ; Un projet dans le cadre de la coopération Tuniso-Algérienne et 1 Projet dans le cadre de la coopération Tuniso- Sud-Africaine.

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
GCMSMS	2011	LBPE
HPLC	2011	LBPE
système de Séquencage HD	2013	Service d'analyse
Chaudière a vapeur	2013	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche

8) Service de Maintenance :

Durant l'année 2016, 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-traitance 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	**5**
Bilatérale	**9**
Avec un Organisme International	**3**

a/ Coopération Multilatérale

Durant l'année 2016, Le CBS a été impliqué dans un nouveau projet européen relevant du programme H2020 de l'UE **EXANDAS** H2020-MSCA-RISE-2015 et un autre projet **ARIMNET** 2 dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed et a continué à entretenir le projet **LMI COSYS-Med** sous tutelle de l'IRD, le projet Tuniso-Japonnais **SATREPS** et le projet **CINEA** FP7-INCO-2013-9, financé par l'UE. Un nouveau projet **Rise IPM-4-** Citrus a été accepté en Décembre 2016 mais ne commencera effectivement que le 01 Avril 2017.

b/ Coopération Bilatérale

Le CBS a été impliqué durant l'année 2016 dans **4** nouveaux Projets dont 3 dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Allemande et 1 projet PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française et a continué à entretenir **6** autres projets dont : PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération Tuniso- Francaise (3) ; coopération Tuniso- Sud-Africaine (1) et coopération Tuniso-Algérienne (2)

c/ Organismes internationaux

Durant l'année 2016, le CBS a bénéficié de 3 subventions de recherche provenant de deux organismes internationaux : The World Academy for Sciences **TWAS** (2) et the International Foundation for Sciences **IFS** (1)

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

Durant l'année 2016, le CBS a signé 3 conventions avec des partenaires socio-économiques dans le cadre de programmes de financement nationaux :

1. **Projet PNRI-KER-LIP** intitulé : « Développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de traitement des peaux ovines : reverdissage, épilage-pelanage et dégraissage enzymatiques »
2. **Projet VRR** intitulé : « Kits basés sur des technologies haut débit pour l'aide au diagnostic moléculaire de maladies génétiques chez la population Nord -Africaine
3. **Projet PRF** : PBMLT intitulé : « Plateforme Biométrique Multimodale de Prévention contre le Terrorisme »

Par ailleurs il a continué sa collaboration avec la Société **SOTULUB** à Bizerte, la société d'Etudes et d'Aménagement des Côtes Nord de la Ville de Sfax **SEACNVS** ainsi que la société **SEDD** évoluant dans le secteur de l'environnement et a réalisé un bon nombre de prestations de services (analyses) au profit de partenaires académiques et socio-économiques.

A/ Liste des invités et missions des chercheurs:

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Amina Ben Ghiyar	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 01 avril au 31 mai
Moez Rhimi	LBME	France	Du 22 avril au 01 mai
Razika Hajij	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 01mai au 30 juin
Sonia Hmich	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 01mai au 30 juin
Fabrice Armougom	LMI Cosys-Med	France	Du 11 au 17 juillet
Vincent Cavailles	PHC-Utique	France	Du 29 aout au 02 septembre
Michel Torrijos	CMCU	France	Du 04 au 08 septembre

Robet Arfi	LMI Cosys-Med	France	Du 18 au 21 septembre
Léo Cabrol	EUROMED 3+3	France	Du 18 au 21 septembre
Tumisang Gerald Seodigeng	Tuniso / Afrique du Sud	Afrique du Sud	Du 23 octobre au 05 novembre
Aoyi Achieng	Tuniso / Afrique du Sud	Afrique du Sud	Du 23 octobre au 05 novembre
Mabuza Janet Nalibogo	Tuniso / Afrique du Sud	Afrique du Sud	Du 23 octobre au 21 novembre
Pierre Monsan	Conseil scientifque élargi	France	Du 01 au 02 Novembre
Michel Manach	Conseil scientifque élargi	France	Du 01 au 02 Novembre
Jean –Jacque Godon	PHC-Utique	France	Du 14 au 18 novembre
Diana Garcia Calderon	CMCU	France	Du 12 au 16 décembre
Badis Abdelmelek	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 14 au 25 décembre
Jean –Claude Sigoillot	CINEA	France	Du 14 au 16 décembre

Nom et Prénom	**Nom du Labo/ Projet**	**Pays**	**Durée**
Samir Bejar	LBMIE	France	Du 18 au 24 janvier
Bassem Jawadi	LBMIE	Algérie	Du 18 au 23 février
Ahmed Rebai	LPCMC	Soudan	Du 19 au 24 février
Ines Belhaj	LBME	Inde	Du 28 février au 10 mars
Sami Sayadi	CINEA	Maroc	Du 24 au 27 février
Faycal Brini	Organisme étranger	Algérie	Du 24 au 26 février
Sami Sayadi	CINEA	France	Du 15 au 18 mars
Radhouane Kamoun	LBPES	France	Du 21 au 26 mars
Sami Sayadi	Organisme étranger	Grèce	Du 30 mars au 02 avril
Ines Belhaj	LBME	France	Du 30 mars au 06 avril
Sonia Khoufi	Tuniso / Afrique du Sud	Afrique du Sud	Du 04 au 13 avril
Fathi Aloui	Tuniso / Afrique du Sud	Afrique du Sud	Du 04 au 13 avril
Raja Gargouri	LBME	Allemagne	Du 05 au 10 avril
Lotfi Mellouli	LMB	France	Du 09 au 15 avril
Slim Tounsi	ARIMNET2	Italie	Du 04 au 07 mai

Noureddine Allouche	ARIMNET2	Italie	Du 04 au 07 mai
Sami Sayadi	EUROMED 3+3	France	Du 12 au 15 mai
Najla Kharat	LPCMC	Koweit	Du 15 au 19 mai
Ali Gargouri	Organisme étranger	France	Du 22 au 27 mai
Saber Masmoudi	LPCMC	Afrique du Sud	Du 22 au 27 mai
Ines Belhaj	LBME	Maroc	Du 22 au 27 mai
Sami Sayadi	Organisme étranger	Afrique du Sud	Du 22 au 27 mai
Sami Sayadi	Organisme étranger	Maroc	Du 31 mai au 04 juin
Sami Sayadi	AUF	France	Du 24 au 30 juillet
Ines Yaakoubi	LBAP	Italie	Du 12 au 17 septembre
Sami Sayadi	Organisme étranger	Japon	Du 14 au 20 septembre
Souaad Rouis	LBPES	Allemagne	Du 19 au 23 septembre
Rania Ben Saad	Organisme étranger	France	Du 26 au 30 septembre
Bassem Jaouadi	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 17 au 28 octobre
Raja Gargouri	LBME	France	Du 24 au 31 octobre
Sami Sayadi	Organisme étranger	France	Du 20 au 22 novembre
Walid Seybi	LBAP	Algérie	Du 21 au 24 novembre
Faiçal Brini	LBAP	Algérie	Du 21 au 24 novembre
Mariem Ellouze	LBPE	Belgique	Du 27 novembre au 03 décembre
Sonia khoufi	CMCU	France	Du 27 novembre au 03 décembre
Sami Sayadi	Organisme étranger	France	Du 27 novembre au 01 décembre
Walid Seybi	Tuniso – allemand	Allemagne	Du 11 au 17 décembre
Faiçal Brini	Tuniso – allemand	Allemagne	Du 11 au 17 décembre
Fatma Driss	LBPES	Turquie	Du 12 au 16 décembre

C/ stages à l'Etranger:

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Mouna Triki	LBME	france	Du 01 janvier au 15 mars
Ahlem Jbeli	Bionexgen	Espagne	Du 01 janvier au 20 juillet
Nedia Mokni	Cosys-med	France	Du 08 au 18 mars
Dorra Ben Ayed	LBME	Italie	Du 20 au 25 mars
Firas Feki	Organisme étranger	Pays bas	Du 27 mars au 16 avril
Mouna Triki	LBME	France	Du 01 avril au 30 juin
Mouna Belhoul	LBMIE	France	Du 01 avril au 30 juin
Sirine Ben Slima	LMB	Espagne	Du 01 avril au 30 juin
Slim Loukil	Tuniso / Afrique du Sud	Afrique du Sud	Du 20 avril au 30 mai
Sana Koubaa	LBAP	Allemagne	Du 29 avril au 12 juillet
Houda Bouhaja	Bioprotech	France	Du 01 mai au 12 juin
Raouia Boujelben	LBPE	Italie	Du 01 mai au 31 juillet
Fatma Boukid	LBAP	Italie	Du 01 mai au 29 juillet
Amal Bouzid	LPCMC	France	Du 01 au 31 mai
Wafa Mihoubi	LBME	Portugal	Du 28 mai au 02 juin
Emna Feki	LBPE	Maroc	Du 31 mai au 03 juin
Mokhles Kwas	LBPE	France	Du 01 juin au 31 aout
Dorra Hentati	LBPE	Espagne	Du 01 juin au 31 juillet
Wafa Mihoubi	LBME	France	Du 15 juin au 08 juillet
Sahar Sallemi	LBAP	France	Du 20 juillet au 20 septembre
Mariem Ellouze	LBPE	Belgique	Du 15 au 27 aout
Mariem Ejday	LBPE	France	Du 01 septembre au 31 décembre
Marwa Jardak	LPCMC	France	Du 01 septembre au 30 novembre
Hana Zouch	LBPE	France	Du 15 septembre au 15 novembre
Mouna Triki	PHC-Utique	France	Du 15 septembre au 31 décembre
Karama Hamdi	LBAP	France	Du 18 septembre au 18 décembre

Dorra Hentati	CMCU	France	Du 19 septembre au 17 décembre
Mariem Cheffi	CMCU	France	Du 19 septembre au 17 décembre
Najla Mhiri	CMCU	France	Du 19 septembre au 03 octobre
Basma Elhaj Kacem	PHC-Utique	France	Du 26 septembre au 09 octobre
Ines Belhaj	LBME	France	Du 01 au 15 octobre
Hatem Rekik	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 17 au 28 octobre
Noura Baccouche	ARIMNET2	France	Du 01 novembre au 30 décembre
Fatma Karray	LBPE	France	Du 15 au 30 novembre
Fatma Driss	LBPES	France	Du 16 au 30 novembre
Najla Mhiri	CBS	France	Du 21 novembre au 05 décembre
Rawiya Boujelben	LBPE	Belgique	Du 28 novembre au 27 décembre
Ines Yaccoubi	Tuniso- coréenne	coréen	Du 30 novembre au 30 décembre
Bichra Mallouli	LPCMC	France	Du 01 au 15 décembre
Fatma Abdelmoula	LBMIE	France	Du 31 décembre2016 au 28 juin 2017

11) Production Scientifique:

	2016
Articles, Revues Internationales	**123**
Brevets nationaux	**8**
Brevets internationaux	**0**
Doctorats et Habilitations Soutenus	**26**
Mastères	**18**
PFE	**7**

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 ELKAMEL Saida : ouvrier catégorie 8

Activités de l'unité

Afin 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 renommée 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 thème: classification décimale de Dewey)
- Nombre des périodiques récents: 27 titres
- Nombre de poste PC: 10 postes, et accès wifi pour les PC portables

- Les accès libre aux bases de données, exemple: Elsevier, Springer, Scopus, Springer protocols…

13) Les journées scientifiques :

1. Maghrebian-Finnish Biotechnology Symposium 2016 **(MFBS 2016):** LBMIE/CBS, LPE/CBBC & LMET/INSAT (Tunisie), & Juva Truffle Center (Finlande), l'A.T.Biotech. & l'Ambassade de Finlande en Tunisie et en Lybie, 19-22 Mars 2016 à Hammamet, Tunisie
2. 4ème Atelier de Formation «Financement de l'Innovation». Organisation par le Centre de Biotechnologie de Sfax, Faculté des Sciences de Sfax et l'API, dans le cadre du projet Européen CINEA, 25-26 Avril 2016 à Monastir, Tunisie
3. 1ère Conférence Méditerranéenne sur la méthanisation, le biogaz et la valorisation énergétique des déchets. Organisation par la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, la Coopération Allemande GIZ-Programme CoMun et le Centre de Biotechnologie de Sfax, 1-2 Juin 2016 à Béni- Mellal, Maroc.
4. Séminaire dans le cadre du LMI COSYS-Med, organisé au Centre de Biotechnologie de Sfax, 19-20 Septembre 2016 à Sfax, Tunisie
5. Third International Conference on Bayesian Networks and Applications , 14-16 Octobre 2016 à Sousse, Tunisie
6. Journées Nationales de Transfert de Technologie JNTT organisée par l'APII, sous l'égide du Ministère de l'Industrie et en partenariat avec le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, l'UTICA et l'Agence Coréenne de la Coopération Internationale « KOICA», 9-10 Novembre 2016 à l'Hôtel Le Palace Gammarth, Tunisie
7. 3èmes Journées Nationales de Dynamisation de la R&I "Recherche et Innovation: Vision, Priorités nationales et Gouvernance" organisées par l'ANPR et ce, sous forme d'ateliers de réflexion, les 16 et 17 décembre 2016 à l'hôtel Royal Hammamet, Tunisie
8. Journées Internationales de Biotechnologie (JIB 2016) de l'A.T.Biotech, 18-22 décembre 2016 à Sousse, Tunisie.

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

LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)

مخبـرالأساليب البيئية

Responsable : Pr. Sami SAYADI

Email : sami.sayadi@cbs.rnrt.tn

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)	Safa Souilem	En post-doc
Sonia Khoufi	M.A.	Fatma Zili	En Thèse
Mariem Ellouze	M.A.	Nehla Mezhoud	En Thèse
Fatma Karray	M.A	Manel Ben Abdallah	En Thèse
Hatem Zaghden	M.A	Fatma Helaoui	En Thèse
Zouhaier Bouallegui	M.A	Fatma Hadrich	En Thèse
Raja Lakhal	M.A	Hanen Chaari Kharrat	En Thèse
Ines Feki	M.A. (ISB-Sfax)	Ines Dahmen	En Thèse
Héla Ghorbel	M.A. (ISB-Sfax)	Raida Bradai Karray	En Thèse
Nozha Abid	M.A. (FS-Sfax)	Alif Chebbi	En Thèse
Sonia Ben Younes	M.A. (FS-Gafsa)	Amina Maalej	En Thèse
Hédia Jemai	As. (FS-Gafsa)	Emna Feki	En Thèse
Firas Feki	Ingénieur général	Ahlem Jebali	En Thèse
Fathi Aloui	Ingénieur en chef	Maha Affes	En Thèse
Mohamed Ali Masmoudi	Ingénieur principal	Asma Saadallah	En Thèse
Manel Hamza	Technologue	Dorra Hentati	En Thèse
Najla Mhiri	Technicien principal	Mokhles Kouas	En Thèse
Slim Loukil	Technicien	Sabrine Ben Ouada	En Thèse
Nidhal Baccar	Technicien	Hana Zouch	En Thèse
Sirine Choura	Ingénieur Contractuel	Imen Siala	En Thèse
Fatma Ben Amor	Technicien contractuel	Meriam Cheffi	En Thèse
Manel Chelbi	Technicien contractuel	Raouia Boujelben	En Thèse
Sonia Kchaou	Préparateur	Najoua Kallel	En Thèse
Selma Kchaou	Secrétaire		

OBJECTIFS DU LABORATOIRE :

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, l'isolement et la caractérisation de nouvelles souches ainsi que l'écologie moléculaire des communautés microbiennes dans les biotopes extrêmes et au cours des procédés de bioremédiation. 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 principaux objectifs du Laboratoire sont

- Approfondir les connaissances sur les processus de dégradation de la matière organique dans les biotopes anaérobies ou aérobies et mettre en œuvre des (micro)organismes (bactéries champignons, microalgues) 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 les bactéries, les champignons et les microalgues, 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.

Les travaux réalisés durant l'année 2016 entrent dans le cadre de 5 projets, cités ci-dessous. Nous présentons dans ce rapport quelques exemples.

INTITULE DES PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS

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

Exemple 1: Etude de l'impact des polluants sur la dynamique des communautés microbiennes dans les zones côtières: Golfe de Gabès:

Les zones côtières, constituent un écosystème très vulnérable soumis à des enjeux environnementaux majeurs entre autre les cycles biogéochimiques du carbone, de l'oxygène et des éléments nutritifs (N, P, Si) et de très fortes pressions anthropiques en raison de la concentration des activités urbaines, industrielles, agricoles et touristiques sur la bande littorale. Des prélèvements de sédiments marins et d'eaux de surface ont été réalisés respectivement en décembre 2012 et en octobre-novembre 2014 dans le cadre du projet «Actions au Sud MIO» MANGA 1 et 2 (**Fig. 1**). Quinze stations ont été échantillonnées dans la région de Sfax-Sud et à Kerkennah dans le cadre du projet MANGA1. Dans le cadre du projet MANGA2, 30 stations ont été échantillonnées. Différents paramètres environnementaux ont été mesurés durant ces campagnes d'échantillonnage (i.e. pH, T°C, salinité). Les analyses des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et des éléments traces métalliques ont été effectuées.

Fig. 1: Localisation des sites des stations marines étudiées à Sfax-MANGA1 (A), à Sfax-MANGA2 (B) et à Gabès-MANGA2 (C).

Les analyses de la diversité prokaryotique dans les sédiments et les eaux de surface prélevés (MANGA1) ont été réalisées en utilisant les techniques d'empreinte génétiques: DGGE et T-RFLP. Les profils DGGE montrent une diversité bactérienne importante dans les sédiments marins et des eaux de surface, en comparaison aux communautés archéennes (**Fig. 2A**). L'analyse des séquences des bandes DGGE excisées ont mis en évidence des populations bactériennes diverses affiliées aux phyla *Bacteroidetes* et *Proteobacteria* (classes *Alpha* et *Beta-Proteobacteria*) dans les eaux de surface. Ces derniers sont considérés comme les groupes les plus abondants des bactérioplancton marins, en particulier dans les zones côtières. Dans le domaine des archées, le phylum *Euryarchaeota* a été détecté. Les espèces archéennes apparentant aux classes *Halobacteria* et *Thermoplasmata* ont été détectées dans les eaux de surface, par contre les classes *Halobacteria* et *Methanobacteria* ont été détectées dans les sédiments marins. L'abondance proportionnelle des bactéries et des archées dans les sédiments marins et les eaux de surface est représentée dans la **Fig. 2B**. Les zones les plus polluées dans la

région de Sfax (PK4, SIAPE et le port de pêche) et Gabès (SIAPE/Port commercial) sont les zones les plus abondantes en communautés bactériennes, quelques soient dans les sédiments marins ou dans les eaux de surface. Ces résultats seront confirmés par l'étude de la diversité bactérienne et archéenne dans les mêmes échantillons en utilisant le séquençage haut débit.

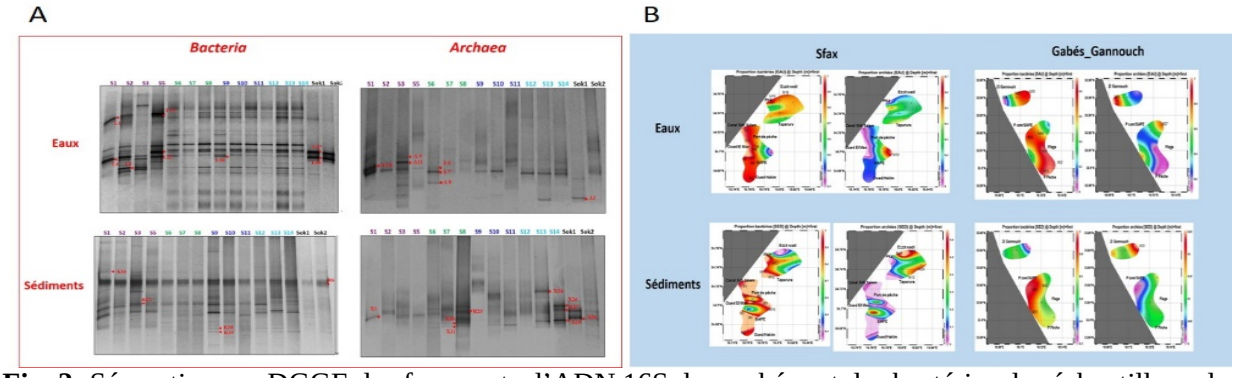


Fig. 2: Séparation par DGGE des fragments d'ADN 16S des archées et des bactéries des échantillons des sédiments et des eaux de surface prélevés dans la région de Sfax-Sud et à Kerkennah (**A**). Représentation de l'abondance proportionnelle des bactéries et des archées dans les sédiments marins et les eaux de surface dans la région de Sfax et Gabès (**B**).

Exemple 2: Valorisation du phosphogypse par production d'hydrogène sulfuré par des bactéries sulfato-réductrices:

Le golfe de Gabès subit d'importantes pressions anthropiques (urbaines, industrielles et agricoles). Depuis le début des années 1970, plusieurs grands sites industriels se sont implantés sur le littoral du golfe, en particulier dans les zones de Sfax et de Gabès. Ces industries produisant des engrais rejettent quotidiennement de grandes quantités de déchets. En effet, la fabrication de l'acide phosphorique génère des quantités importantes de phosphogypse qui sont entreposées à terre sous forme de terrils ou directement rejetées en mer. Le phosphogypse se compose essentiellement de sulfate de calcium di-hydraté ($CaSO_4$, $2H_2O$) (plus de 70%), et de teneurs variables en impuretés, telles que la silice, le fluor, etc. Certains Eléments Traces Métalliques (ETM) sont retrouvés en quantités importantes tels que le cadmium, le mercure, et le plomb. Certains phosphogypses contiennent également des éléments radioactifs, tels que l'uranium.

Vu que le phosphogypse est composé en majeure partie par du sulfate de calcium, nous avons envisagé sa valorisation par extraction du soufre avec des bactéries sulfato-réductrices et sulfo-oxydantes. Les bactéries sulfato-réductrices présentent un groupe écophysiologique unique parmi les procaryotes qui utilisent le sulfate comme accepteur final d'électrons en anaérobiose pour tirer de l'énergie et dégrader une large gamme de composés organiques, tout en produisant de l'hydrogène sulfuré. Différentes concentrations en phosphogypse (PG) (10, 20 et 40 g/l), différents inocula (sédiment marin, boues aérobie et anaérobie…) et des donneurs d'électrons variés (lactate, hydrogène…) ont été testés. L'évolution de la production de sulfure par les bactéries sulfato-réductrices en fonction du temps a été suivie. La production de H_2S atteint presque 300 mM soit 10,2 g H_2S/l. Le pourcentage de conversion du PG en H_2S est presque de 100% (99,43% pour la boue anaérobie avec 20 g/l PG et en présence d'H_2/CO_2). Les cultures d'enrichissement présentant une production importante de H_2S ont été choisies pour étudier la biodiversité et l'abondance bactérienne existantes. Les différents profils DGGE obtenus montrent une diversité spécifique selon le type d'inoculum et le donneur d'électrons utilisé (**Fig.**

3). L'analyse des séquences des bandes DGGE obtenus ont mis en évidence la présence d'une communauté bactérienne appartenant aux phyla *Synergistetes*, *Thermotogae* et *Spirochaetes.*

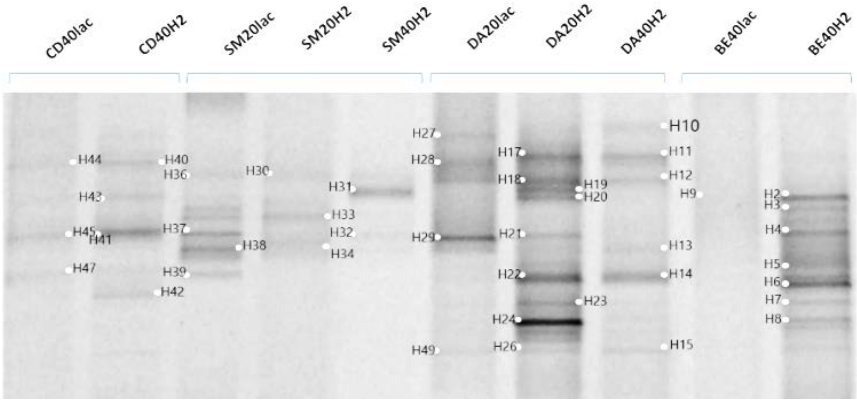


Fig. 3: Séparation par DGGE des fragments d'ADNr 16S des bactéries présentes dans des cultures d'enrichissements.

Trois bactéries sulfato-réductrices ont été isolées à partir des enrichissements inoculés par des sédiments marins prélevés du Golfe de Gabes. Sur la base des données de séquençage et de l'analyse des gènes codant pour l'ARNr 16S, parmi les 3 souches isolées, une nouvelle espèce appartenant au genre *Desulfobulbus* a été identifiée.

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

Exemple: Bactéries marines hydrocarbonoclastes et biosurfactants:

Nous nous intéressons dans le cadre du projet «Bioremédiation», à l'isolement et la caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes à partir de différents environnements naturels et industriels, l'étude de la biodégradation des hydrocarbures (aliphatiques, monoaromatiques, polyaromatiques, complexes «pétrole, mazout, essence, huile de moteurs…»), la production et la carctérisation des biosurfactants, ainsi qu'à l'étude de la biodiversité microbienne et de sa dynamique, moyennant les outils moléculaires. Dans cette partie d'étude, nous avons orienté nos investigations vers le milieu marin contaminé par des hydrocarbures, en particulier vers certains ports tunisiens (de pêche, de commerce).

La caractérisation physico-chimique des échantillons étudiés (pH, température, salinité, DCO, DBO_5, TOC, azote, phosphore, hydrocarbures totaux, minéraux, métaux) prouve une contamination par des micropolluants organiques (hydrocarbures) et inorganiques (métaux), qui sont considérés comme des excellents traceurs de la pollution urbaine et industrielle et ils font partie des composés les plus toxiques étant donné leur faible biodégradabilité.

Une souche bactérienne marine «FLU5» a été isolée à partir des eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax, après des enrichissements sur le fluoranthène, un HAP composé de trois noyaux aromatiques et d'un cyclopentane. Cette souche possède des capacités biodégradatives sur le fluoranthène, en l'absence de l'extrait de levure et en présence de 30 g/l NaCl. Les caractérisations phénotypique et phylogénétique montrent que la souche «FLU5» est membre du genre *Bacillus* et qu'elle est étroitement reliée à l'espèce *Bacillus stratosphericus* (similarité de l'ARNr 16S de 99,66%) (**Fig. 4**). Les analyses GC-MS montrent que la bactérie hydrocarbonoclaste «FLU5» est capable de dégrader 44,5% du fluoranthène (100 mg/l) au bout de 30 jours d'incubation. Elle est capable également de croître sur une large gamme

d'hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et complexes (octane, BTEX, acide gallique, acide gentisique, pyrène, pétrole brut, mazout,…), utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie.

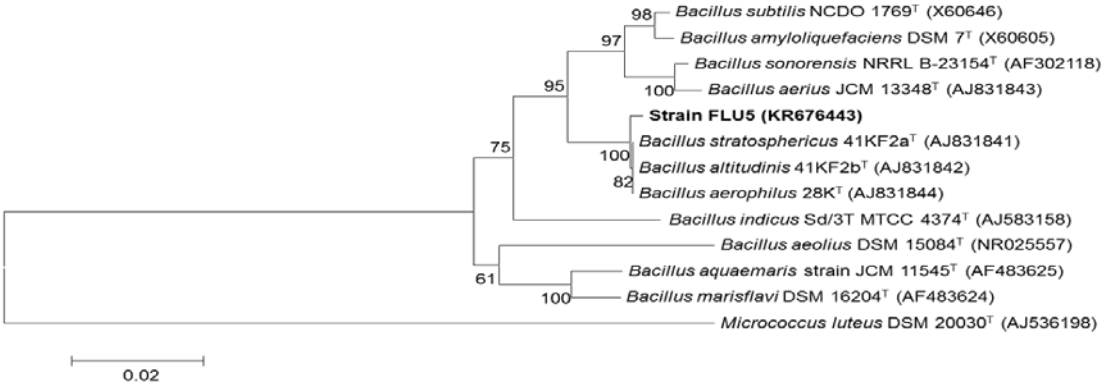


Fig. 4: Arbre phylogénétique montrant l'affiliation de la souche «FLU5» au sein du genre *Bacillus*.

Une diminution de la tension de surface (TS) et un test positif de déplacement d'huiles ont été constatés au cours de la croissance de la souche «FLU5». Ces phénomènes pourraient être expliqués par la synthèse de biosurfactants capables de réduire la tension de surface et de rendre, ainsi, le polyaromatique mieux accessibles aux cellules pour être dégradé.

L'étude de la stabilité des biosurfactants synthétisés par la souche «FLU5» montre qu'ils sont stables après des incubations jusqu'à 121 °C. De même, la stabilité vis-à-vis de pH n'est pas affectée jusqu'au pH 12. Concernant l'effet de la salinité, la tension de surface reste stable jusqu'à des concentrations élevées en NaCl de 120 g/l. La concentration micellaire critique de BS-FLU5 est de 50 mg/l. Les biosurfactants produits (BS-FLU5) ont été purifiés et analysés par la technique MALDI-TOF/MS. BS-FLU5 appartiennent à la famille des lipopeptides, et en particulier aux surfactines (**Fig. 5**).

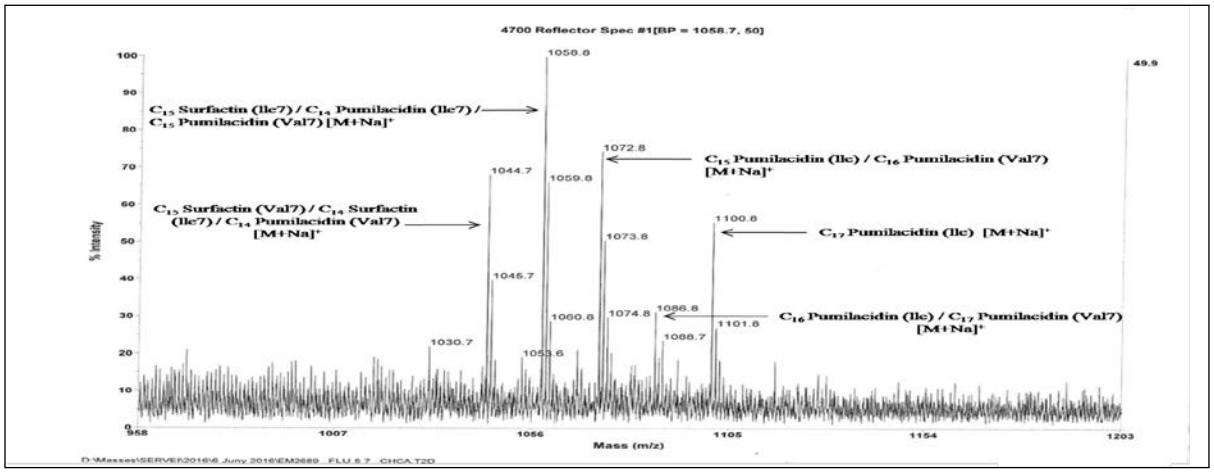


Fig. 5: Spectre de masse MALDI-TOF-MS des lipopeptides purifiés produits par la souche *Bacillus stratosphericus* «FLU5».

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 CO_2 et la dépollution de

l'air et des eaux. Différents biotopes Tunisiens ont permis d'isoler différentes 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 souches *Amphora subtropica*, *Amphora* sp. et *Navicula* sp., ont été retenues comme meilleures productrices de lipides avec 11%, 14% et 10% (de matière sèche MS), respectivement. Ces souches ont la capacité de former des agrégats et de se décanter naturellement ce qui réduit énormément le coût de la récolte. L'optimisation de la composition du milieu et des paramètres de culture moyennant les méthodes des plans d'expériences, a permis une croissance plus rapide et une teneur intracellulaire en lipides plus élevée pour les trois souches. Ces microalgues ont été soumises à différentes conditions de stress ce qui a permis d'augmenter encore la teneur en lipides intracellulaires. L'addition de 1 g/l de glucose dans le milieu de culture d'*Amphora subtropica* permet une augmentation de la teneur en lipides à 55% (MS), en gardant le même profil en acides gras que celui des conditions optimisées, avec apparition de C18:2. Une carence en phosphore dans le milieu de culture d'*Amphora* sp., augmente sa teneur en lipides à 53%, avec une richesse en acides gras saturés et mono-insaturés (64 et 22%, respectivement). Cette carence favorise la synthèse de nouveaux acides gras polyinsaturés (AGPI, 13%) qui sont principalement C20:5 et C20:4. Une limitation en azote dans le milieu de culture de *Navicula* sp., augmente sa teneur en lipides à 31% avec une richesse du profil en acides gras en C16:0 et C16:1. En se basant sur ces résultats, les trois diatomées sont donc productrices potentielles de biodiesel de bonne qualité. La méthode d'extraction et de transestérification agit également sur le profil en acides gras et le rendement en biodiesel. En effet, l'extraction des lipides à partir de la biomasse fraiche donne un meilleur rendement et la transestérification directe donne une quantité de biodiesel plus élevée, surtout en utilisant le chloroforme comme solvant d'extraction.

Outre les acides gras, les extraits lipidiques (EL) des microalgues contiennent en faibles teneurs, des pigments et des polyphénols ayant des pouvoirs antioxydant et antimicrobien. L'effet antioxydant de l'extrait lipidique de *Dunaliella* sp., riche en AGPI, montre un pouvoir protectif contre le dysfonctionnement hépatorénale induit par le nickel chez les rats blancs «Wistar». *In vivo*, le co-traitement des rats par EL et Ni ($Ni_{(traitement)}$ + EL) a diminué le niveau du malondialdéhyde et restauré les activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx) dans le foie et les reins et a aussi amélioré les paramètres biochimiques et histologiques, en comparaison avec des rats intoxiqués par le Ni. Une tentative de valorisation du coproduit de l'extrait lipidique de *Dunaliella* sp. a été effectuée dans l'alimentation animale. Après extraction des lipides, le coproduit montre une richesse en fibres, en protéines et en métabolites secondaires. Le modèle animal choisi est le lapin «Néo-Zélandais». L'alimentation des lapins avec ce coproduit, a permis d'améliorer la qualité de la viande et d'augmenter la masse corporelle et des organes, elle a diminué les troubles gastro-intestinaux et a fourni une protection contre le stress oxydatif et les altérations induites par le nickel au niveau du foie et des reins.

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)

La digestion anaérobie de la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) qui est un déchet très hétérogène, variant dans le temps en qualité et quantité, a été étudiée. 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. La caractérisation physico-chimique de la FFOM a été également 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.

Parmi les méthodes physiques, chimiques et biologiques, le prétraitement par des cellulases fongiques, est une approche plus écologique. Ainsi, des essais de culture avec des champignons sur des milieux contenant différentes sources de carbone et d'azote ont été conduits afin de produire des cocktails enzymatiques ayant un effet hydrolytique sur la FFOM. L'application de ces cocktails enzymatiques pour l'hydrolyse de la FFOM a montré une amélioration de la solubilisation de la matière organique ainsi que l'augmentation de la concentration des sucres réducteurs dans le surnageant (**Fig. 6**). Les essais de la digestion anaérobie de la FFOM pré-hydrolysée ont montré une augmentation significative du rendement en méthane, en comparaison avec la FFOM brute (**Fig. 7**).

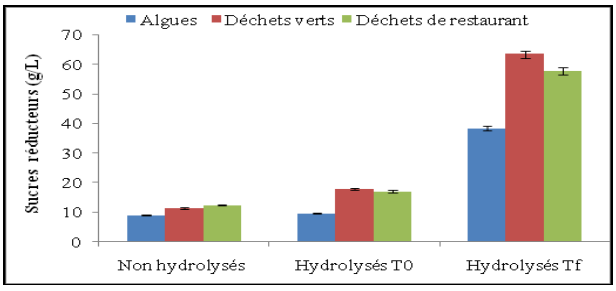


Fig. 6: Amélioration de la concentration des sucres réducteurs libérés suite à l'hydrolyse

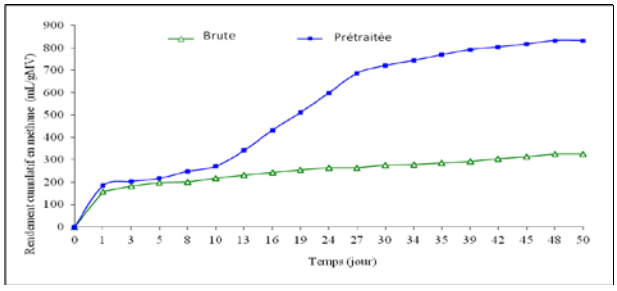


Fig. 7: Evolution du rendement cumulatif en méthane durant la fermentation

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

Exemple: Etude de l'efficacité de molécules bioactives issues de l'olivier contre la toxicité des agents utilisés en chimiothérapie: cas du cisplatine:

L'exposition répétée à certains agents toxiques ou médicaments peut avoir des répercussions importantes au niveau rénal. Parmi les néphropathies toxiques, nous citons la néphrotoxicité des chimiothérapies, en particulier du cisplatine. La prévalence de la néphrotoxicité du cisplatine est largement connue chez un grand nombre de patients traités par cette substance. Elle apparaît en général quelques jours après l'administration du cisplatine et se manifeste par la diminution de la filtration glomérulaire associée à plusieurs perturbations biochimiques. De nos jours, plusieurs études sont orientées vers l'exploitation de ressources naturelles telles que les plantes en vue d'extraire des principes actifs qui pourront être utilisés comme adjuvants pour réduire les effets secondaires de la chimiothérapie. Ainsi, l'objectif du présent travail était d'étudier les

potentialités d'un extrait de feuilles d'olivier ainsi que son composé majoritaire, l'oleuropéine, à réduire la toxicité induite par le cisplatine, un agent de la chimiothérapie anti-cancéreuse.

L'étude à porté sur la préparation et la caractérisation d'un extrait (ethanol 70%) de feuilles d'olivier collectées dans la région de Sfax. L'extrait a été obtenu avec un rendement d'extraction de l'ordre de 18,8% par rapport à la masse sèche des feuilles. L'analyse qualitative a montré que les feuilles de la variété Chemlali Sfax renferment une forte concentration en oleuropéine extrait qui est de 13% des feuilles sèches. De plus l'analyse nous a permis de déduire que l'oleuropéine constitue environ 69% de l'extrait préparé. À côté de l'oleuropéine une faible teneur en flavonoïdes a été aussi mise en évidence. Nous avons pu identifier trois composés mineurs y compris la luteoline-7-glucoside, l'apigénine-7-glucoside, et le verbascoside.

Afin d'examiner le potentiel néphroprotecteur des molécules bioactives issues des feuilles d'olivier vis-à-vis du cisplatine, les cellules rénales HEK-293 (human embryonic kidney cells) ont été utilisées comme modèle cellulaire. Dans cette partie nous avons opté pour l'étude de l'effet de l'extrait des feuilles d'olivier (Ext), de l'oleuropéine (Ole) et du cisplatine (CD) sur la prolifération des cellules HEK-293. Cette étape nous a permis plus tard de choisir les concentrations qui seront utilisées lors des traitements couplés (CD+Ole et CD+Ext). Les résultats obtenus montrent que quel que soit le traitement, le taux de prolifération cellulaire reste significativement inférieur au contrôle (**Fig. 8**). D'autre part, seul l'extrait à la dose de 20 µg/ml qui s'est montré capable d'améliorer la prolifération cellulaire d'une manière significative par comparaison au traitement par le cisplatine à 10 µM. En présence de 15 µM cisplatine, l'extrait des feuilles d'olivier ainsi que l'oleuropéine ont un effet protecteur significatif sur la viabilité cellulaire.

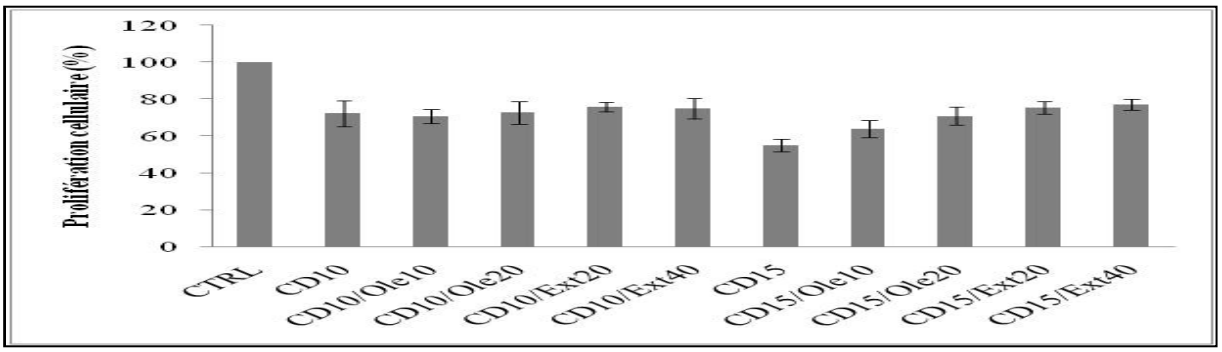


Fig. 8: Effet de l'extrait et de l'oleuropéine sur la prolifération des cellules HEK-293 traitées par le cisplatine.

La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'épuisement des systèmes antioxydants et l'accumulation des produits de la peroxydation lipidique induits par le cisplatine, sont responsables de divers types de dommages oxydatifs dans les cellules rénales. La présente partie a été consacrée à l'étude de l'effet de l'extrait des feuilles d'olivier ainsi que l'oleuropéine sur le stress oxydatif survenant en présence du cisplatine. L'évaluation du stress oxydatif a été effectuée par le dosage des ROS par fluorescence (test au DCFH-DA) et la mesure de la peroxydation lipidique par colorimétrie (test TBARS). Après le traitement avec le cisplatine (CD 10 µM), les cellules HEK-293 ont montré une augmentation de la fluorescence dérivant de la conversion du DCFH-DA en DCF (passant de 7,18 ± 0,3 pour le contrôle à 11,06 ± 0,73 pour l'essai). Ceci permet de mettre en évidence une augmentation de la génération des espèces réactives de l'oxygène, par conséquent, l'induction d'un état de stress oxydatif. Les résultats

montrent aussi que l'addition de l'extrait (CD10/Ext40) ou bien de l'oleuropéine (CD/Ole20) permet le rétablissement du statut oxydatif des cellules HEK-293.

A partir de ces résultats, on remarque que le cisplatine augmente significativement la teneur de substances réactives avec l'acide thiobarbiturique (TBARS), comme produits de la peroxydation lipidique. L'extrait (40 µg/ml) et l'oleuropéine (20 µg/ml) réduisent significativement la teneur des TBARS observée suite au traitement par le cisplatine (de 1,65 à 0,89 et 0,95, respectivement). La nephrotoxicité de la chimiothérapie (cas du cisplatine) est entre autres liée à la génération des espèces réactives de l'oxygène causant ainsi des dommages importants aux cellules. Les conséquences peuvent se manifester par une peroxydation lipidique dépendante de l'augmentation des ROS. Certaines études suggèrent que la mesure des TBARS après le traitement par le cisplatine peut être utile pour la prédiction des lésions rénales associées à la chimiothérapie.

Publications parues en 2016 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture :

1) Bechambi, O., Jlaiel, L., Najjar, W., Sayadi, S. **(2016**). Photocatalytic degradation of bisphenol A in the presence of Ce-ZnO: Evolution of kinetics, toxicity and photodegradation mechanism. *Materials Chemistry and Physics*, 173: 95-105.
2) Bechambi, O., Najjar, W., Sayadi, S. **(2016)**. The nonylphenol degradation under UV irradiation in the presence of Ag-ZnO nanorods: Effect of parameters and degradation pathway. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 60: 496-50.
3) Ben Abdallah, M., Karray, F., Mhiri, N., Mei, N., Quéméneur, M., Cayol, J.-L., Erauso, G., Tholozan, J.-L., Alazard, D., Sayadi, S. **(2016**). Prokaryotic diversity in a Tunisian hypersaline lake, Chott El Jerid. *Extremophiles*, 20 (2): 125-138.
4) Ben Younes, S., Cherif, I., Dhouib, A., Sayadi, S. **(2016**). *Trametes trogii*: A biologic powerful tool for dyes decolorization and detoxification. *Catalysis Letters*, 146 (1): 204-211.
5) Boudabbous, M., Saibi, W., Bouallagui, Z., Dardouri, M, Sayadi, S., Belghith, H., Mechichi, T., Gargouri, A. **(2016)**. A fast activated-charcoal pre-purification of *Fusaruim solani* β-glucosidase for an efficient oleuropein bioconversion. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. DOI: 10826068.2016.1201679.
6) Chebbi, A., Jaoua, H., Loukil, S., Mhiri, N., Ammar, N., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2016**). 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*, 13(2): 571-580.
7) Dahmen-Ben Moussa, I., Bellassoued, K., Athmouni, K., Naifar, M., Chtourou, H., Ayadi, H., Makni-Ayadi, F., Sayadi, S., El Feki, A., Dhouib, A. **(2016**). Protective effect of *Dunaliella* sp., lipid extract rich in polyunsaturated fatty acids, on hepatic and renal toxicity induced by nickel in rats. *Toxicology mechanisms and methods*, 26 (3): 221-230.
8) Dahmen-BenMoussa, I., Chtourou, H., Rezgui, F., Sayadi, S., Dhouib, A. **(2016)**. Salinity stress increases lipid, secondary metabolites and enzyme activity in *Amphora subtropica* and *Dunaliella* sp. for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 218: 816-825.
9) Dammak, I., Khoufi, S., Sayadi, S. **(2016)**. A performance comparison of olive oil mill wastewater enzymatic treatments. *Food and Bioproducts Processing*, 100: 61-71.

10) Dammak, I., Neves, M., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. **(2016**). Recovery of polyphenols from olive mill wastewater using drowning-out crystallization based separation process. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 34: 326-335.
11) Hadrich, F., Garcia, M., Maalej, A., Moldes, M., Isoda, H., Feve, B., Sayadi, S. **(2016**). Oleuropein activated AMPK and induced insulin sensitivity in C2C12 muscle cells. *Life sciences*, 151: 167-173.
12) Hadrich, F., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Feki, I., Isoda, H., Feve, B., Sayadi, S. **(2016)**. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chemico-biological interactions*, 252: 54-60.
13) Hentati, D., Chebbi, A., Loukil, S., Kchaou, S., Godon, J.-J., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2016**). Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15):15088-15100.
14) Mechri, S., Ben Elhoul Berrouina, M., Omrane Benmrad, M., Zaraî Jaouadi, N., Rekik, H., Moujehed, E., Chebbi, A., Sayadi, S., Chamkha, M., Bejar, S., Jaouadi, B. **(2016)**. Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. *International Journal of Biological Macromolecules. (Part A)*, 94: 221-232.
15) Mesbaiah, F. Z., Eddouaouda, K., Badis, A., Chebbi, A., Hentati, D., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2016**). Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus* sp. under thermophilic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14): 14221-14230.
16) Karray, R., Hamza, M., Sayadi, S. **(2016)**. Production and characterization of enzymatic cocktail produced by *Aspergillus niger* using green macroalgae as nitrogen source and its application in the pre-treatment for biogas production from *Ulva rigida*. *Bioresource Technology*, 216: 622-628.
17) Karray, F., Mezghani, M., Mhiri, N., Djelassi, B., Sayadi, S. **(2016)**. Scale-down studies of membrane bioreactor degrading anionic surfactants wastewater: Isolation of new anionic-surfactant degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114: 14-23.
18) Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., El Feki, A., Damak, M., Sayadi, S., Allouche, N. **(2016)**. LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian Juniperus phoenice leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55: 1-8.
19) Jemli, M., Zaghden, H., Rezgi, F., Kchaou, S., Aloui, F., Sayadi, S. **(2016**). Biotreatment of petrochemical wastewater: a case study from Northern Tunisia. *Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation*. DOI: 10.2175/106143016X14609975746082.
20) Mekki, A., Awali A, Aloui F, loukil S. et Sayadi S. (**2016)**. Characterization and Toxicity Assessment of wastewater from Rock phosphate processing in Tunisia. *Mine Water and the Environment*. DOI 10.1007/s10230-016-0424-2.
21) Pradel, N., Cayol, J.L., Fardeau, M.L., Karray, F., Sayadi, S., Alazard, D., Ollivier, B. **(2016)**. Analysis of a population of magnetotactic bacteria of the Gulf of Gabès, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (5): 4046-4053.
22) Smaoui, Y., Chaabouni, M., Sayadi, S., Bouzid, J. **(2016)**. Coagulation-flocculation process for landfill leachate pretreatment and optimization with response surface methodology. *Desalination and Water Treatment*, 57 (31): 14488-14495.
23) Souilem, S., Treesuwan, W., Kobayashi, I., Khalid, N., Bouallagui, Z., Neves, M. A., Uemura K., Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. **(2016**). Simulation of oleuropein structural conformation in vacuum, water and triolein-water systems using molecular dynamics. *Food Research International*, 88: 79-90.
24) Touati, A., Hammedi, T., Najjar, W., Ksibi, Z., Sayadi, S. **(2016)**. Photocatalytic degradation of textile wastewater in presence of hydrogen peroxide: Effect of cerium doping titania. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 35: 36-44.

25) Zaghden, H., Serbaji, M. M., Saliot, A., Sayadi, S. **(2016**). The Tunisian Mediterranean coastline: potential threats from urban discharges Sfax-Tunisian Mediterranean coasts. *Desalination and Water Treatment*, 1-13. DOI: 10.1080/19443994.2016.1149107.
26) Zayen, A., Schories, G., Sayadi, S. **(2016**). Incorporation of an anaerobic digestion step in a multistage treatment system for sanitary landfill leachate. *Waste Management*, 53: 32-39.
27) Zili, F., Bouzidi, N., Ammar, J., Zakhama, W., Ghoul, M., Sayadi, S., Ben Ouada, H. **(2016)**. Mixotrophic cultivation promotes growth, lipid productivity, and PUFA production of a thermophilic *Chlorophyta* strain related to the genus *Graesiella*. *Journal of Applied Phycology*, 1-9. DOI: 10.1007/s10811-016-0941-1.

- Chapitres d'ouvrage:

1) Manel Hamza, Sami Sayadi. **(2016)**. The possibility of recovering of hydroxytyrosol from olive milling wastewater by enzymatic bioconversion. In: *Products from olive tree*. (Eds. Bokou, D. & Clodoveo, M.L.). Chapter 14, pages 263-281. Published by INTECH. DOI: 10.5772/64774.

- Brevets nationaux d'invention:

1) Criblage et propriétés d'une nouvelle protéase thermoactive et thermostable produite par la souche d'*Aeribacillus pallidus* VP3 d'intérêt biotechnologique dans la formulation des détergents de lavage et la synthèse peptidique. MECHRI Sondes, BEN ELHOUL Mouna, OMRANE BENMRAD Maroua, ZARAI JAOUADI Nadia, REKIK Hatem, CHEBBI Alif, SAYADI Sami, CHAMKHA Mohamed, BEJAR Samir, JAOUADI Bassem. TN2016/0429 (07-10-2016).
2) Optimisation de la production, par méthodologie des plans d'expériences, et détermination des propriétés d'une nouvelle protéase (nommée SAPLF) de la souche C250R de *Lysinibacillus fusiformis* d'intérêt industriel. MECHRI Sondes, KRIAA Mouna, BEN ELHOUL Mouna, BERROUINA Mouna, OMRANE BENMRAD Maroua, ZARAI JAOUADI Nadia, REKIK Hatem, MOUJEHED Emna, CHEBBI Alif, SAYADI Sami, CHAMKHA Mohamed, BEJAR Samir, JAOUADI Bassem. Déposé le 05-10-2016.

- Liste des habilitations soutenues:

1) **Sonia Khoufi:** Développement des bioprocédés pour le traitement et valorisation des déchets organiques: récupération d'antioxydants et production du biogaz. Habilitation Universitaire en Génie Biologique, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS). Soutenue le 03/09/2016.

- Liste des thèses de doctorat es-sciences soutenues:

- **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, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax (ENIS). Soutenue le 23/01/2016.
- **Ines Dahmen Ben Moussa:** Production des acides gras poltinsaturés par culture de microalgues. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 23/11/2016.
- **Fatma Zili:** Modélisation de l'effet des facteurs physico-chimiques sur la composition et le profil lipidique de deux espèces thermophiles, une cyanobactérie et une chlorophycée, isolées des eaux géothermales de la Tunisie**.** Thèse de doctorat en Sciences Biologiques et Biotechnologie, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir (ISBM). Soutenue en 12/2016.

- **Manel Ben Abdallah:** Etude de la diversité microbienne (bactéries et archées) d'un environnement hypersalé Tunisien, le Chott El Jerid: applications biotechnologiques. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 15/12/2016.
- **Raida Karray Bradai:** Etude de la valorisation biotechnologique des macroalgues vertes *Ulva rigida* par des procédés enzymatiques et par biométhanisation. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de Sfax (FSS). Soutenue le 19/12/2016.
- **Fatma Hadrich:** Etude des effets des extraits de feuilles d'olivier ainsi que l'oleuropéine purifiée sur l'obesité associée à la résistance à l'insuline: Elucidation du mécanisme d'action dans le modèle *in vitro* et *in vivo*. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 22/12/2016.

1) 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.
2) Convention d'assistance de la société SEDD (Reconduction pour une nouvelle année).

- **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».
- **PHC-Utique: *2015-2017*:** 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*:** Optimisation et modélisation de la co-digestion anaérobie des déchets solides. Entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux et le Laboratoire INRA de Biotechnologie de l'Environnement de Narbonne.
- **Projet bilatéral Tunisie-Afrique du Sud: *2015-2017*:** Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by advanced oxidation processes. Entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux et l'Université de Technology de Vaal.
- **Projet de coopération Tunisie/Wallonie-Bruxelles: *2016-2018***: Amélioration de la digestion anaérobie des déchets solides: hydrolyse enzymatique. Coopération entre le Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux et l'Université Libre de Bruxelles.
- **Laboratoire Mixte International: *2014-2019*:** LMI COSY-MED: Contaminants et écosystèmes marins sud méditerranéens.
- **H2020-MSCA-RISE-2015 Grant Agreement number: 691247 «EXANDAS»: *2016-2020*:** Exploitation of aromatic plants' by-products for the development of novel cosmeceuticals and food supplements.

- **SATREPS - Projet Tuniso-Japonais:** ***2016-2021*****:** Valorization of bio-resources based on scientific evidence in semi and arid land for creation of new industry through valorization of bio-resources in North Africa.

1) 4ème Atelier de Formation «Financement de l'Innovation». Organisation par le Centre de Biotechnologie de Sfax, Faculté des Sciences de Sfax et l'API, dans le cadre du projet Européen CINEA. Monastir, 25-26/4/2016.
2) 1ère Conférence Méditerranéenne sur la méthanisation, le biogaz et la valorisation énergétique des déchets. Organisation par la Faculté des Sciences et Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Béni Mellal, la Coopération Allemande GIZ-Programme CoMun et le Centre de Biotechnologie de Sfax. Béni- Mellal, Maroc, 1-2/6/2016.
3) Séminaire LMI COSYS-Med, au Centre de Biotechnologies de Sfax, 19-20/9/2016.
4) 3èmes Journées Nationales de Dynamisation de la R&I "Recherche et Innovation: Vision, Priorités nationales et Gouvernance" organisées par l'ANPR et ce, sous forme d'ateliers de réflexion, les 16 et 17 décembre 2016 à l'hôtel Royal Hammamet, Tunisie

LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes

(LBME)

مخبـرالبيوتكنولوجيا الجزيئيّة للكائنات معزولة النوّاة

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
Emna DABBECHE	Contrat Assistant	FM Sfax
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 Biologique	CBS
Dorra BEN AYED-GUERFALI	Docteur en Génie Biologique	CBS
Salma ABDELJALIL-TRABELSI	Docteur en Sciences	CBS
Rania ABDELMAKSOUD-DAMAK	Docteur en Génie Biologique	CBS
Aref NEIFAR	Docteur en Génie Biologique	CBS et INSTM-Sfax
Yosra KAMOUN	Docteur en Sciences	CBS
Ines BEN HMAD-KRID	Docteur en Génie Biologique	CBS
Naourez DAMAK-BOUJELBEN	Docteur en Génie Biologique	CBS
Ines BORGI	Docteur en Sciences	CBS
Hajer TOUNSI	Docteur en Génie Biologique	CBS
Azza HADJ SASSI	Docteur en Génie Biologique	CBS
Hanen MALLEK	Docteur en Sciences	CBS
Awatef TAKTAK- BEN AMAR	Docteur en Génie Biologique	CBS
Manel BOUDABBOUS- BENAMOR	Docteur en Génie Biologique	CBS
Nihel AMMOUS- BOUKHRIS	Docteur en Génie Biologique	CBS
Mouna ALOULOU	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Wafa MIHOUBI	Thèse (Sciences Biologiques)	FS BIZERTE
Sihem IBN ABID	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Nesrine ALLAYA	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Emna KTATA	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Amena SAADALLAH- KALLEL	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS
Mouna TRIKI	Thèse (Sciences Biologiques)	ENIS et I RC
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

Amine JABLAOUI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Nizar AKERMI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS et INRA PARIS
Hamed AMMAR	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

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 le cancer et les maladies génétiques R. Gargouri

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS:

Projet 1 : Exploitation de la beta glucosidase de *Fusarium solani* dans des réactions d'hydrolyse et de synthèse de molécules à haute valeur ajoutée

Durant l'année écoulée, nous avons tenté d'exploiter cette enzyme dans deux directions principales : d'une part l'hydrolyse de molécules de type aromates glycosilés et d'autre part, la synthèse de moléucles douées de nouvelles propriétés. Nous avons réalisé l'hydrolyse de certains arylβ-glucosides comme l'amygdaline (AM), l'esculine (E), la salicine (Sal) et l'arbutine (AR) par la FBgl1, qui s'est avérée efficace et totale. Le test du pouvoir antioxydant de chaque arylβ-glucoside traité ou non par la FBgl1 montre que la différence n'est significative qu'avec l'esculine et l'arbutine. Seul l'aglycone de l'AR, l'hydroquinone, atteint un pourcentage antioxydant (90%) plus élevé que l'antioxydant de référence, le BHT, un puissant antioxydant synthétique, présentant un pourcentage égal à 70%. Ces résultats encouragent la bioconversion de l'arbutine par la FBgl1 et l'exploitation de l'hydroquinone dans l'industrie alimentaire ou cosmétique comme antioxydant. En ce qui concerne l'hydrolyse de l'AM, nous avons noté un mécanisme différent des mécanismes cités dans la littérature. Ce mécanisme est constitué par 4

réactions assurées par la FBgl1. Les tests préliminaires de la cytotoxicité montrent que le produit final de l'hydrolyse de l'AM a un effet cytotoxique considérable sur les cellules HeLa.Outre l'hydrolyse, la FBgl1 est capable de réaliser des réactions de synthèse de biomolécules très recherchées dans l'industrie pharmaceutique. Comparée aux autres enzymes, la FBgl1 est capable de réaliser des réactions de synthèse en présence de faible concentration de substrat, en comparaison aux fortes concentrations qui sont habituellement utilisées lors des réactions de synthèse par d'autres β-glucosidases. L'analyse des réactions de synthèse à partir des saccharides a montré que la FBgl1 est capable de réaliser ce type de réaction à partir du cellobiose et du gentiobiose. L'analyse par chromatographie couche mince (CCM) montre que les oligosaccharides obtenus varient selon le substrat utilisé. Pour le cellobiose, le modèle de synthétise des oligosaccharides est atypique : la FBgl1 associe deux molécules de cellobiose pour former le cellotétraose. Ce dernier est alors clivé en cellotriose et glucose.Nous envisagerons depurifier et d'identifier les biomolécules obtenues suite aux bioconversions réalisées par la FBgl1 et de les exploiter dans des applications biotechnologiques.

Etudes et Exploitation de deux endoglucanases halophiles de *S. microspora*

Le présent travail entre dans le cadre de l'axe de recherche de production et de l'exploitation de deux endoglucanases purifiées 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. Nous avons réussi à purifier deux endoglucanases EG1 et EG2. Rappelons que ces deux cellulases ont une activité optimale à une température de 50°C et à un pH égal à 7. L'intéressant est qu'EG1 et EG2 sont halophiles (et surtout EG1): elles sont activées en présence de NaCl avec un optimum à 5M et 0.8M, respectivement. Il est à relever que l'halophilie de l'enzyme EG1 est très intéressante à plus d'un titre : elle est sécrétée par une souche mésophile, elle est unique dans le monde fongique, elle devrait permettre d'entrevoir des applications particulières. Dans ce contexte, nous avons montré que le jus extracellulaire de notre souche 19 garde son activité même dans l'eau de robinet ou l'eau de mer !.Par ailleurs, une des rares enzymes bactériennes présentant le même degré d'activation par le sel a été cristallisée et a révélé une structure très particulière : toutes les charges extérieures sont de type négatif grâce à l'exposition des résidus de type acide. Nous pensons que notre enzyme aurait la même structure mais nous devons vérifier ceci après isolement du gène et établissement de la structure tridimensionnelle dela EG1.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. La dernière caractéristique d'EG1 nous a incités à appliquer cette enzyme dans la formulation des détergents commerciaux et à la comparer avec une cellulase commercialisée. EG1 montre une très grande stabilité dans la plupart des détergents commerciaux testés alors que la cellulase commercialisée est pratiquement inhibée. L'étude de l'effet du NaCl sur les propriétés biochimiques d'EG1 montre qu'en présence de 5M NaCl, la température optimale passe de 50°C à 70°C !!. En revanche, l'activité relative ne dépasse pas 16% en absence de NaCl. De même, le pH optimum passe de 7 à 8, avec une amélioration importante de l'activité à pH 10.

Effet de l'ajout des pectinases sur le rendement d'extraction d'huile d'olive et évolution des paramètres physico-chimiques au cours du stockage

Les enzymes pectinolytiques ont été proposées pour être utilisées dans le secteur oléicole. Les olives ayant servi à la réalisation de ce travail proviennent de la variété « Chemlali » à deux stades de maturité (olives vertes et olives noires), elles sont extraites par une chaine continue à deux phases. Grâce à l'ajout des jus enzymatiques lors du malaxage, une amélioration dans le rendement d'extraction est enregistrée pour les deux types d'olives de 1.5 à 2.5 %. Il est intéressant de relever que l'apport des enzymes était plus notable sur les olives vertes que les noires. L'acidité est considérée comme un critère important pour l'évaluation de la qualité de l'huile. En effet, l'augmentation de l'acidité de l'huile reflète une certaine hydrolyse de cette huile, généralement causée par une contamination fongique pendant le stockage d'olives. Nous avons constaté qu'au cours du stockage des huiles une légère augmentation de l'acidité, tout en maintenant la différence entre le témoin et les huiles traitées et tout en gardant partout une valeur inférieure à 0.8%, (valeur exigée pour une huile d'olive de type extra- vierge), tout au long du stockage. Donc l'ajout des pectinases a permis : 1-Une réduction du nombre de groupe acide libre (acide oléique) dans l'huile issue de traitement enzymatique. L'acidité est plus élevée dans l'olive noire que la verte ; 2- L'utilisation des pectinases du mutant CT1 a permis une amélioration significative du taux de carotène (35%) et de la chlorophylle (20%). En plus, les olives vertes donnent un taux significativement plus élevé que les olives noires pour ces deux pigments. 3-Une amélioration significative du taux de polyphènols (15%) ; 4- Une réduction du nombre de groupe acide libre (acide oléique) dans l'huile issue de traitement enzymatique. L'acidité est plus élevée dans l'olive noire que la verte. 5- Le coefficient d'extinction $_{K232}$ connaît une évolution lente durant les six premiers mois et ensuite une augmentation plus marquée et rapide ne dépassant pas de 2,5. Le coefficient d'extinction $_{K270}$ connaît une évolution rapide jusqu'au ^{6ème} mois de conservation due à l'accumulation des produits secondaires d'oxydation.

Clonage et caractérisation moléculaire du gène β-glucosidase de *Talaromyces thermophilus*

L'objectif de cette partie de travail est de cloner le gène β-glucosidase « Glu T.tls » de la souche *Talaromyces thermophilus* dans la perspective d'une expression hétérologue d'une part, et d'analyser la séquence du gène, réaliser des études de modélisation de la structure-fonction de cette protéine.Le génome de cette souche nous a permis de choisir les amorces des gènes β-glucosidases de la souche *T. thermophilus* de notre laboratoire qui est nommée « AX4 ». On a déjà trouvé que cette souche peut secréter trois β-glucosidases de tailles différentes, pour cela nous avons focalisé notre attention sur les gènes qui peuvent être à l'origine des β-glucosidases de taille moléculaire compris entre 95 et 116 kDa. Un couple d'amorce (Bgl 4 et Bgl 6) a été sélectionné couvrant un fragment de 2633pb. Le gène β-glucosidase de *T.tls* contient trois introns et code pour un ORF codant pour une protéine de 817 acides aminés. La réaction d'amplification menée par ce couple d'amorce sur l'ADN génomique de *T.tls*, nous a permis d'isoler un fragment de taille 2633pb. Le séquençage de l'insert porté par le plasmide recombinant (P10) moyennant des oligonucléotides spécifiques du vecteur de clonage a permis de confirmer que le produit obtenu par PCR s'agit bien du gène de la β-glucosidase de *Talaromyces thermophilus*. La séquence montre une phase ouverte de lecture codant pour une protéine mature de 817 Aa qui fait 95 kDa.Nous avons séquencé 480 pb à partir du début de

l'ORF, 513 pb au milieu et 444 pb à la fin. Le début et la fin de l'ORF montrent une homologie presque 100% avec le gène de la β-glucosidase de *T. thermophilus* NRRL 2155 et avec une faible différence dans la partie située au milieu du gène.

L'activité galactolipase de la lipase TTL de *Talaromyces thermophilus*

Talaromyces thermophilus est un champignon thermophile capable de secréter une activité lipolytique (TTL) dans un milieu contenant le son de blé comme unique source de carbone. Malgré sa composition riche en hémicellulose (40%) et faible en acides gras (4.5%), le son de blé induit une activité lipase plus importante que celle induite par l'huile d'olive. En fait, le son de blé n'était pas décrit auparavant comme une source inductrice des lipases, qui est de surcroit bien meilleure même que les inducteurs classiques que sont les lipides. L'hypothèse que cette lipase pourrait avoir une activité galactolipase a pu être avancée. La TTL est une vraie lipase qui présente l'une des activités les plus élevées sur les triglycérides à différentes longueurs de chaînes, elle montre également une activité phospholipase sur le PC du jaune d'œuf. Des travaux récents réalisés dans l'EIPL ont montré que la TTL exerce, en plus, une activité galactolipase très intéressante sur des substrats galactolipidiques mono-galactosyl-diglycéride en C8 (diC8-MGDG) et di-galactosyl-diglycéride en C8 (diC8-MGDG). Cette activité est la plus élevée parmi toutes les lipases microbiennes testées jusqu'à présent avec les galactolipides synthétiques à chaîne moyenne avec une affinité beaucoup plus considérable vis-à-vis des diC8-MGDG. Une activité spécifique de 40500 ± 125 U/ mg a été mesurée à un pH optimal de 8. Les plus fortes activités mentionnées précédemment avec la FSC (984 ± 62 U / mg), la TLL (450 ± 41 U / mg) et la FSL 4658 ± 146 U/mg étaient donc beaucoup plus faibles. La TTL est plus active sur les TG à chaînes moyennes. En effet, l'activité spécifique de l'enzyme pure est de 24000 U/mg mesurée dans les conditions optimales de pH et de température et en utilisant la TC8 comme substrat. Par contre, l'activité spécifique mesurée sur TC4 est de 7300 U/mg. L'activité de la TTL sur une émulsion d'huile d'olive se situe entre celle sur les TG à chaînes moyennes et celle sur les TG à chaînes courtes (9800 U/mg). Ces activités étaient encore plus élevées sur les galactolipides (le DiC8-MGDG). Il s'agit bien d'une lipase avec une large spécificité vers différentes classes de lipides.L'activité de la galactolipase de la TTL a été aussi mesurée par la technique de barostat et à l'aide des films mono-moléculaires de C12 MGDG [1,2-di-O-dodécanoyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-sn-glycérol] et C12-DGDG [1,2-di-Ododecanoyl-3-O- (6-O-α-D-galactopyrannosyl-β-D-galactopyranosyl-sn-glycérol] comme substrats précédemment synthétisés. Ces galactolipides à chaîne moyenne ont été sélectionnés dans les études antérieures parce qu'ils forment des films mono moléculaires stables à l'interface air-eau tandis que leur produits de lipolyse sont solubles dans l'eau [9, 12, 20]. Sur le C12-MGDG, la TTL était plus active que la TLL et la cutinase avec une activité maximale de 0.162 mol cm-^{2} min^{-1} M^{-1} atteinte à 25 mN/m contre 0.014 mol cm^{-2} min^{-1} M^{-1} et 0.007 mmol cm^{-2} min^{-1} M^{-1} pour la cutinase à une pression superficielle inférieure à 12 mN / m. Cette activité est moins importante que celle enregistrée avec la rGPLRP2 à une pression de 10 mN/m et qui est de l'ordre de 2,05 mmol cm-^{2} min^{-1} M^{-1}. Sur les C-12 DGDG, nous avons observé qu'à une pression de 15 mN/m, la TTL est beaucoup plus active (58.78 10^{-3} mol cm^{-2} min^{-1} M^{-1}) que la TLL (0.06 10^{-3} mol cm^{-2} min^{-1} M^{-1}) et que la GPLRP2 dont l'activité s'annule complètement en dépassant une pression de 10 mN/m. Cette dernière montre des activités beaucoup plus importantes (allant jusqu'à 2.12 mol cm^{-2} min^{-1} M^{-1}) à des pression de l'ordre de 7 mN/m.

Fonctionnalisation des fibres d'alfa prétraitées pour améliorer la durabilité des bio-composites alfa/polymères

L'intérêt de cette partie est d'élaborer un mécanisme d'extraction des fibres d'alfa afin d'optimiser un processus d'extraction des fibres unitaires longues tout en conservant ses propriétés mécaniques. Une extraction des fibres d'Alfa par voie chimique en utilisant de l'hydroxyde de sodium (NaOH) et une caractérisation des faisceaux des fibres obtenues mécaniquement par la machine DMA de la marque Bose (Electroforce 3200). Ainsi, il s'avère que ces fibres ont un comportement mécanique comparable à celui des autres fibres végétales connues comme le chanvre et le lin. Différents protocoles d'extraction enzymatique ont été effectués afin d'obtenir des fibres de la plante Alfa et ce, en essayant différents paramètres d'extraction (temps, température et dosage). Des observations microscopiques par le microscope optique de type Bresser DM400 Digital Microscope été effectués pour examiner la surface de la fibre après chaque traitement. Une corrélation a été établie entre la structure (densité, diamètre, longueur, taux de cellulose, angle microfibrillaire, taux d'adsorption d'humidité…) et les propriétés mécaniques des fibres cellulosiques obtenues. Ce projet vise à : 1-contribuer au développement de nouveaux bio-composites, mécaniquement performants, en adoptant des méthodes biologiques dès l'extraction des fibres d'Alfa jusqu'à l'élaboration des matériaux ; 2-production d'une quantité importante d'enzymes (pectinases et xylanases) en utilisant des fermenteurs. ; 3-Préparation des échantillons de fibres d'Alfa selon différentes méthodes d'extraction (traitements mécaniques, chimiques et enzymatiques). L'organigramme suivant illustre les différentes stratégies utilisées :**Travaux réalisés**

- L'élaboration des bio-composites PLA/Fibres d' Alfa et Cereplast/Fibres d'Alfa. Le procédé de mélange utilisé est l'extrusion bi-vis et le procédé de mise en forme employé est le moulage par injection.
- Etude de l'impact des divers traitements sur les propriétés des fibres en réalisant des essais d'analyse chimique, morphologique (FQA et MEB), structurale (FTIR) et thermique (ATG).
- Réalisation des essais mécaniques (traction, flexion et choc Charpy), thermiques (DSC et ATG), morphologiques (MEB) et hygroscopiques (résistance à l'eau).

Projet 2 :

I. Production de molécules lipidiques à usages chimiques et énergétiques par culture de levures oléagineuses, caractérisation microbiologique et biochimique des souches de levures oléagineuses nouvellement isolées

Les huiles microbiennes constituent une source importante d'approvisionnement en lipides et acides gras de hautes valeurs ajoutées pouvant remplacer de nombreux composés issus de la pétrochimie. Dans ce cadre, nous avons isolé de nouvelles souches de levures à partir de différents biotopes comme les fromages, les produits de charcuterie, margine, fleurs, sol, ect. Le criblage de 205 clones de levures nous a permis d'isoler 12 nouvelles souches oléagineuses en utilisant la technique fluorométrique basée sur la coloration par le Rouge de Nile. 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, Naganishia, Yarrowia, Candida, Trichosporon et Cyberlindera.* Les compositions acidiques des lipides produits par les différentes souches ont été analysées par chromatographie en phase

gazeuse (CPG). En plus du pouvoir oléagineux, nous avons exploité d'autres potentialités chez les souches nouvellement isolées tel que les activités enzymatiques (lipase, CMCase, β-glucosidase, xylanase) la production de biosurfactant et de pigment. Des études qualitatives et quantitatives sont en cours.

I.2. Etude moléculaire des gènes impliqués dans l'accumulation de lipides chez la levure Y-E4

L'augmentation du taux de production des lipides est déclenchée par la surexpression des enzymes clés, la régulation négative du catabolisme des acides gras et par inhibition de la β-oxydation. Le Diacyl-glycerol-acyl-transferase (DGAT) est l'un des gènes clés de la voie de synthèse des triglycérides codant une enzyme qui intervient dans la dernière étape de biosynthèse des triglycérides. Nous avons proposé de cloner et de sur-exprimer ce gène afin d'améliorer génétiquement la levure *Candida viswanathii* Y-E4. Un fragment de 1600 pb a été amplifié et séquencé. Nous avons étudié le niveau d'expression de ce gène par la Q-PCR qui a montré une surexpression en fonction du rapport C/N avec un maximum de ratio de 9.7 à un C/N 100. Un deuxième gène, le Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPD) responsable de la conversion du DHAP en glycérol-3-phosphate (G3P), précurseur de la biosynthèse *de novo* des triglycérides, est aussi étudié. Un fragment de 1112 pb qui englobe la totalité du gène est séquencé et cloné. Le niveau d'expression du gène GPD est en cours de réalisation.

I.3. Bioconversion de la matière lignocellulosique et production de lipide microbien par culture de levure oléagineuse (*Trichosporon cutaneum*)

Le coût élevé de la production des lipides par les microorganismes oléagineux reste toujours un facteur limitant. Le recours à la bioconversion des sous-produits et des déchets issus des secteurs industriels permettra de contourner en partie cette contrainte. La coque d'orge est un résidu lignocellulosique issu de la transformation d'orge. L'étude biochimique de ce composé a montré une richesse en carbohydrates (77%) dont principalement l'hémicellulose et la cellulose (43.2% et 30.6% respectivement) avec 10% de lignine. Sur milieu synthétique (glucose et/ou xylose comme source de carbone), la souche de levure CTM-30125 de *Trichosporon cutaneum* est capable d'assimiler simultanément les sucres en (C5-C6) et d'accumuler aux alentours de 4.58 g/L de lipide correspondant à une teneur de 43.6 % (m/m). Cependant, lorsqu'elle est cultivée sur hydrolysat acide de coque d'orge (HACO), la teneur en lipide ne dépasse pas les 17%. Une étape de détoxification a permis d'améliorer significativement la fermentabilité du HACO. Une analyse par HPLC de ce dernier, montre une diminution des taux des inhibiteurs tel que les HMF, furfural et acide acétique avec une réduction de la teneur en azote donnant ainsi des rapports C/N faibles. La fraction solide résultant du traitement acide de la coque d'orge a été traitée avec un complexe enzymatique produit par la souche fongique hyper-cellulolytique *Trichoderma reesei* Rut C-30. D'autre part, les changements structurels de la matière première native et traitée ont été étudiés en utilisant les spectres FTIR. Le HACO détoxifié et l'hydrolysat enzymatique ont été successivement fermentés par la levure *Trichosporon cutaneum* dans un bioréacteur en mode Fed-batch sans addition de source d'azote externe. Une biomasse totale de 17,5 g/L avec une teneur en lipides de 38,2% (correspondant à un rendement lipidique de 6,7 g/L) sont obtenues après 168 h de culture. La composition relative en acides gras de lipide produit, déterminé par GC/MS, indique la présence d'un taux élevé d'acide gras saturés (41.2%)

et mono-saturés (52.5%). Les paramètres physicochimiques du biodiesel issu de la trans-estérification de lipide issue de la culture de *T. cutaneum* indique une bonne conformité aux normes internationales.

Les lipides et les pigments d'origine fongique : Production et application biotechnologique

Les lipides fongiques

Dans le but de révéler les champignons producteurs de lipides, les souches isolées ont subi une étape de criblage qualitatif, effectué grâce à l'utilisation de deux colorants (Noir de Soudan et le Rouge de Nil) spécifiques des composés lipidiques, suivie d'un criblage quantitatif. Parmi les champignons isolés, deux souches fongiques CO8 (*Mucor circinelloides*)et E4-2 (*Fusariumverticillioides*) ont été retenues. L'étape suivante a été consacrée à l'étude des paramètres influençant la production de lipides à savoir la source et la quantité d'azote, la source de 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 les deux souches, a été également étudié. Les lipides accumulés par CO8 et E4-2 ont été analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse. L'évaluation de la qualité des lipides produits par la souche E4-2 pour la production de biodiesel a été étudiée en comparaison avec les normes standards : Norme standard européenne (EN), ASTM et le pétrole diesel. Les résultats montrent que les lipides de la souche E4-2 sont conformes avec ces normes. Dans le cadre d'amélioration de la qualité et de la quantité des lipides extraits à partir de la souche E4-2 de *Fusaruim verticilloides*, les méthodes d'extraction par fluide supercritique et par macération ont été testées. Les résultats montrent que le rendement en lipides extraits par la méthode au CO_2 supercritique est faible par rapport à celle réalisée par le mélange de solvants organiques. Les extraits lipidiques obtenus, de coloration rougeâtre, par ces deux méthodes d'extraction 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.Dans une autre partie du travail, l'effet des extraits lipidiques sur des cellules cancéreuses HT29 a été testé. L'observation microscopique et le test MTT montrent que certains de ces extraits provoquent une mortalité des cellules en culture. Les tests préliminaires de marquage de l'ADN et de l'actine ont montré que cette mortalité n'est pas vraisemblablement de type apoptotique.

Les pigments d'origine fongique

Au cours des travaux effectués sur la production des lipides, nous avons constaté que la souche E4-2 est capable de produire différents pigments en modifiant les paramètres du milieu de culture (source de carbone, source d'azote, pH, température, etc….). En effet, la variation de la source de carbones et celle de l'azote montre que le glycérol, le maltose et le saccharose ainsi que le nitrate de sodium, le nitrate d'ammonium, l'urée et l'extrait de levure ont un effet positif sur la production d'un pigment rouge par cette souche. D'autres part, les extraits colorés intracellulaires et extracellulaires obtenus à partir de la souche E4-2 ont été séparés par une chromatographie sur couche mince en utilisant le chloroforme, le méthanol et l'acide acétique (47 :1 :2.5) comme phase mobile. Les résultats ont montré que les extraits sont hétérogènes et contiennent un mélange de plusieurs couleurs. L'effet des fractions séparées à partir de la chromatographie sur couche mince ainsi que des surnageants de différentes cultures sur des

cellules cancéreuses HT29 a été testé. L'observation microscopique et le test MTT montrent que certains de ces extraits provoquent une mortalité des cellules en culture.

Potentialités antifongiques du peptide AcAFP

Expression hétérologue du peptide antifongique « AcAFP »

L'expression du gène *acafp* codant pour le peptide antifongique AcAFP secrété par *A. clavatus* a été amorcée en utilisant le système hétérologue procaryote *E. coli* BL21. Nous avons réussi à cloner les trois formes peptidiques du gène acafp à savoir : la forme pré-pro ou totale (pourvue de la séquence signale du gène) de 284 pb, la forme large (forme mature additionnée de six acides aminés : DESAVQ) de 172 pb et la forme mature de 154 pb dans le vecteur d'expression pET21a(+). Le meilleur niveau de production du peptide AcAFP recombinant a été observé sur milieu LB, avec une induction durant toute une nuit à 23°C et en présence de 0.5 mM d'IPTG. La présence de la forme mature aussi bien dans la fraction soluble que sous forme précipitée au niveau des corps d'inclusion (sous forme mono, di et tétramérique) a été montrée. Cependant les trois formes peptidiques surexprimées et purifiées à homogénéité ne montrent pas des potentialités antifongiques intéressantes comparées à celles présentées par le peptide AcAFP natif, ce qui nous a poussés à utiliser la souche mutante d'*E. coli* : Origami. Cette souche contient des mutations dans les gènes codant pour la thiorédoxine réductase trxB et glutathion réductase permettent une meilleure formation des ponts disulfures dans le cytoplasme et donc, en principe, un meilleur repliement du peptide AcAFP qui est riche en résidus cystéine (8cys) dont 6 sont impliqués dans des ponts disulfures. Parallèlement, nous conduisons l'expression de la forme mature et de la forme large, dérivées de l'AcAFP, dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* en utilisant le vecteur pPICZαC contenant un promoteur fort inductible par le méthanol.

Décryptage du mécanisme d'action de l'AcAFP

Le mécanisme d'action, décrypté précédemment, moyennant la microscopie confocale, semble impliquer la paroi cellulaire fongique du champignon sensible *F. oxysporum* comme cible primaire du peptide antifongique AcAFP. Dans cette optique et en se basant sur les caractéristiques biochimiques et moléculaires, établies, nous avons pensé à déterminer le rôle que pourrait jouer le CBD dans la toxicité que manifeste le peptide AcAFP à l'encontre de plusieurs phytopathogènes. Cette étude a été réalisée par l'établissement d'un test d'inhibition contre la collection bien caractérisée des mutants de *F. oxysporum* dans des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire (ΔpacC, pacCc, Δfmk1 et Δcon), dans la biogenèse de la chitine pariétale (chsV, chs7, ChsVb) et dans la biogénèse du β1,3 glucane (Δgas et Δgnet2/5). Les résultats montrent que les souches mutantes, dont la biogénèse de la chitine pariétale de la famille V est affectée, présentent une sensibilité beaucoup plus importante vis-à-vis du peptide AcAFP que la souche sauvage avec 80% d'inhibition de croissance à partir de 1µg/mL. Parallèlement, l'étude et la quantification de la fixation du CBD-Tamra, peptide synthétisé chimiquement, par les différents mutants moyennant la microscopie à fluorescence et la cytométrie à flux a montré une corrélation entre la capacité de fixation du CBD (communément appelé « Chitin Bindig Domain ») à la paroi cellulaire et la sensibilité des mutants au peptide AcAFP, sachant que le peptide « CBD » ne présente aucun effet inhibiteur sur la croissance des cellules fongiques. De plus des tests de cytotoxicité (test MTT) n'ont montré aucun effet

cytotoxique du peptide CBD sur trois lignées cellulaires : MCF7, HepG2 et NP69 en présence de doses allant de 1 µg/ml jusqu'à 100 µg/ml.

Etude moléculaire et fonctionnelle d'un ABC transporteur fongique

Au cours de ce travail, nous avons abordé l'étude moléculaire et fonctionnelle d'un transporteur ABC de *Penicillium occitanis*. Dans un premier temps, nous avons eu recours à des expériences de PCR et de criblage de la banque génomique du mutant CT1 de *P. occitanis*afin d'isoler un gène codant pour un transporteur ABC de *P. occitanis*. Dans le but d'étudier les caractéristiques moléculaires du gène cloné, nous avons analysé, à l'aide des programmes informatiques, la séquence nucléotidique isolée. L'analyse de la séquence montre que le gène cloné code pour un ABC transporteur qui présente une grande homologie avec la sous-famille des PDR (Pleiotropic Drug Resistance). Les transporteurs appartenant à cette sous-famille sont le plus souvent associés à la résistance aux antifongiques. Une deuxième partie du travail a été consacrée à l'étude fonctionnelle de ce transporteur par inactivation du gène. Pour ce faire, une expérience de transformation de la souche mère CL100 a été réalisée en utilisant une cassette de délétion constituée de deux fragments PCR chevauchants dont l'un porte 1 kb de la partie promotrice du gène ABC et une partie du gène de résistance à l'hygromycine et l'autre fragment comporte une partie du gène Hyg^R et environ 1 kb de la région 3' terminale du gène à étudier. Ces essais ont permis d'obtenir quelques transformants qui poussent sur milieu sélectif contenant l'hygromycine. Une amplification par PCR sur l'ADN génomique de CL100 et de certains transformants moyennant des amorces spécifiques du gène hph4 (codant pour la résistance à l'hygromycine) a été réalisée. Un fragment d'ADN de taille attendue a été amplifié à partir du plasmide *pAN7-1* (utilisé comme témoin positif) et de certains transformants isolés. L'amplification par PCR grâce aux amorces spécifiques du gène ABC montre l'absence du fragment d'ADN dans certains clones. Une troisième amplification a été réalisée en utilisant un oligonucléotide sens spécifique du gène hph et une amorce antisens du gène ABC. Cette réaction a permis d'obtenir un fragment de taille attendu à partir de l'ADN génomique de certains transformants (Ce fragment est absent dans la réaction d'amplification réalisée sur l'ADN génomique de la souche sauvage).Pour la suite du travail trois clones (6, 9 et 10) ont été retenus.Dans le but d'étudier la fonction de ce transporteur chez *P. occitanis*, une analyse du comportement des trois transformants isolés ainsi que la souche mère vis-à-vis de certains antifongiques a été entamée. Pour ce faire, deux techniques ont été adoptées à savoir : le test sur boite et celui sur plaque en présence de différentes concentrations d'antifongiques à savoir le cycloheximide, la nystatine, le G418 et le caspofungine ainsi que d'autres substances telles que l'acide oléique, le kanamycine et le BET. Aucune différence dans le comportement de ces souches vis-à-vis des substances étudiées n'a été observée. L'étude de l'effet d'autres composés est en cours de réalisation.

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

Le pouvoir entomopathogène de deux souches de laboratoire *Beauveria bassiana* (P1 et P2) a été testé sur la mineuse de tomate *Tutaabsoluta*, dans le but de les exploiter comme bio-insecticide 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 5.10^7 spore/ml de cette souche peut causer une mortalité larvaire de 100 % après 5 j de traitement. Nous comptons la comparer avec des biopesticides commerciaux à base de spores de Beauveria et d'estimer le coût de notre pesticide.

Recherche de molécules inhibitrices de la tyrosinase et de la mélanogenèse

Après un criblage des inhibiteurs de la tyrosinase parmi des dérivés des adduits de **Morita-Baylis-Hillman (MBHD)**, nous avons passé à la recherche des inhibiteurs de la mélanogenèse des cellules cancéreuses de mélanome de murine B16F10. Le résultat de cette étude montre que le traitement des cellules par les molécules **1a, 3b** et **5f** ont diminué la quantité de la mélanine et de l'activité tyrosinase intracellulaire à une concentration de 50 µM, sachant que nous avons montré que les concentrations testées sur cette lignée cellulaire ne sont pas cytotoxiques. En utilisant la technique d'analyse Western Blot, on a trouvé que ces molécules ont inhibé l'expression de la tyrosinase dans les cellules B16F10. L'étude de l'effet des 4 composés inhibiteurs de la tyrosinase trouvés appartenant à la famille de ferrocenyl-aryl-butene sur la production de la mélanine dans les cellules B16F10 est en cours de réalisation.

Projet 3 :

Cancers gastro-intestinaux

Détermination du statut CIMP et de l'expression de DNMT dans les cancers colorectaux en vue d'une meilleure classification des tumeurs

Le phénotype Méthylateur des ilots CpG CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) est un critère déterminant dans la classification des tumeurs colorectales afin d'adapter le traitement pour une meilleure prise en charge des patients. Nous avons déterminé par MS PCR le statut de méthylation d'un panel de 7 gènes afin d'identifier le statut CIMP. Nous avons classé les tumeurs en 2 groupes CIMP+ (au moins 5 promoteurs méthylés) et CIMP- (< 5 promoteurs méthylés). Dans notre série, nous avons trouvé que 26 tumeurs sont CIMP+, 12 sont methylées pour les 5 promoteurs alors que seuls 4 cassont totalement non méthylés. L'analyse statistique a révélé que 19 (70.4%) tumeurs CIMP+ sont localisées dans le colon gauche et le rectum (P=0.034), et que la plupart des tumeurs CIMP- sont MSS (80.8%) (MSS :microsatellite stable) alors que 60 % des tumeurs CIMP+ sont MSI-H (P=0.008)(MSI-H : microsatellite Instability-High). En considérant le profil de méthylation du promoteur MLH1, M pour méthylé et U pour non méthylé, nous avons classé les tumeurs en 4 groupes CIMP+/MLH1-M (n = 17), CIMP+/MLH1-U (n = 9), CIMP−/MLH1-M (n = 25), and CIMP−/MLH1-U (n = 31). Nous avons montré que ces 4 groupes diffèrentdans la localisation tumorale (P = 0.048), l'invasion lympho-vasculaire (P = 0.024), le statut MSI (P = 0.016), et la mutation B-raf (P = 0.023). En terme de survie, nous avons montré que les patients avec des tumeurs CIMP-/MLH1-M ont une durée de survie significativement plus longue (*P log rank*=0.001).Nous avons également associé le statut CIMP avec le profil de méthylation de P16en montrant que la survie est plus courte chez les patients avec des tumeurs CIMP+/P16-M (*P log rank* = 0.01*)*. D'autre part, nous avons déterminé le niveau d'expression du gène DNMT dans ces tumeurs et montré que le niveau de DNMT1 est significativement plus élevé dans les tissus tumoraux vs tissus sains de même que

dans les tumeurs CIMP+ vs CIMP-. Le taux de DNMT1 est corrélé avec l'âge (P=0.024), le degré de différentiation (P=0.021), l'invasion vasculaire (P=0.004), et le stade TNM (P=0.037).Nos résultats soulignent l'intérêt de mieux caractériser sur le plan moléculaire les tumeurs colorectales.

Identification par HRM de mutations hot-spot du gène PIK3CA dans le cancer colorectal

La voie de signalisation PI3K / AKT / joue un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. Elle est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses, la plupart des protéines la constituant pouvant être mutées, délétées ou surexprimées. L'un des acteurs de cette voie qui est le plus souvent activé dans le CRC suite à des mutations au niveau des exons 9 et 20 est le gène PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalyticsubunit alpha). Nous avons recherché les mutations hot-spots par PCR- HRM au niveau de l'exon 9 en utilisant des standards pour la mutation E545K.Nos résultats ont montré d'autres profils différents de ceux obtenus pour la mutation E545K.En effet, nous avons identifié 17.6% de mutations, il s'agit des mutations : E545K, E545A, et une double mutation E542K et S553fs*7 dans un seul cas. Nous avons également ciblé le gène PTEN qui est un antagoniste de cette voie de signalisation. Nous avons montré que le promoteur PTEN est méthylé dans 60% des cas, ce qui entraine sa perte d'expression. Finalement, des corrélations entre le statut mutationnel de PIK3CA, la méthylation de PTEN et les différents paramètres clinico-pathologiques ont été recherchées.

RIP140 et LCoR dans les cancers intestinaux

Parmi les voies de signalisation les plus dérégulées dans les cancers gastro-intestinaux, la voie Wnt/β-caténine est impliquée dans le développement et la progression de ces cancers.Le co-régulateur transcriptionnel RIP140 contrôle l'homéostasie et la tumorigenèse intestinale en réprimant la voie Wnt/β-caténine, ce facteur interagit très fortement au niveau fonctionnel avec un autre co-régulateur transcriptionnel appelé LCoR. Nous avons réalisé l'étude par immunohistochimie de l'expression de RIP140 et LCoR dans 103 et 41 échantillons d'adénocarcinomes colorectaux et gastriques respectivement. Les résultats ont montré une association positive entre l'expression de ces 2 protéines aussi bien dans les CCR ($p < 0.01$) que dans les CG ($p < 0.0012$). D'autre part, elle a pu confirmer d'une part la diminution des taux d'expression de RIP140 dans les échantillons de CCR et d'autre part que les niveaux d'expression de RIP140 et LCoR dans le CG sont plus importants dans le tissu tumoral que dans la muqueuse saine adjacente. L'analyse statistique a permis de dégager certaines corrélations significatives entre les paramètres clinico-pathologiques et l'expression de ces deux marqueurs. Dans le CCR, l'expression de RIP140 corrèle avec le stade TNM ($p= 0.001$) alors que celle de LCOR est plus élevée chez les patients de plus de 60 ans et dans les tumeurs peu différenciées ($p= 0.014$). Dans le CG, l'expression de RIP140 est significativement associée avec la différentiation tumorale ($p=0.007$) et au type histologique ($p< 0.02$). Quant à LCoR, son expression a été corrélée avec le type histologique diffus. L'analyse de la survie a montré que dans le CCR, l'expression élevée de RIP140 corrèle avec une durée de survie plus longue ($p< 0.044$), et dans le CG, l'expression faible de LCoR est associée à une durée de survie globale

plus longue (p< 0.017). Ces résultats soulignent l'intérêt de RIP140 et de LCoR dans les CCR et CG en tant que marqueurs pour une meilleure prise en charge des patients.

Rôle de l'EBV dans la modulation de l'expression des miARNs cellulaires dans le cancer gastrique associé à l'EBV.

Dans cette partie, notre exploration était orientée vers l'étude du rôle du virus d'Epstein Barr (EBV) dans l'expression différentielle des miARNs cellulaires dans les cas de cancer gastrique associé à l'EBV.Dans un premier temps, nous avons établi par « small RNA Cloning » les profils de miARNs et les avons comparé dans 2 groupes d'échantillons: Groupe 1 : ARN extraits de biopsies tumorales gastrique de statut EBV+, Groupe 2 : ARN extraits de biopsies tumorales gastrique de statut EBV-.Suite à un séquençage haut débit des 2 types de banques de miARNs correspondant aux groupes 1 et 2, nous avons sélectionné certains miARNs differentiellement exprimés dans les biopsies EBV+ et EBV-.Dans un second temps, nous avons validé le profil de 5 miARNs (miR-210, miR-34-a, miR-25-3p, miR-150 et miR-142) sur 25 biopsies tumorales par PCR en temps réel (QPCR). Nous avons trouvé une corrélation entre les résultats du séquençage haut débit et les valeurs d'expression relatives des miARNs étudiées estimées par Q-PCR. En effet, nous avons confirmé par PCR en temps réel que les niveaux d'expression des miR-210, miR-34a et miR-25-3p sont significativement plus élevés dans les cas de cancer gastrique associés à l'EBV. En revanche, les miR-142 et miR-150 ont montré une diminution d'expression dans ces mêmes cas de cancer gastrique associés à l'EBV. Par ailleurs, il est parfaitement établi que les miARNs sont reconnus comme étant des régulateurs importants de plusieurs processus biologiques capables de réprimer plusieurs gènes cibles, soit par dégradation de l'ARNm cible ou par répression traductionnelle. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur les miRNAs 34-a, 210 et 25-3p afin d'analyser leur cibles protéiques comme l'E-cadhérine, la β-caténine, la P53 et l'APC par Immunohistochimie.En effet, pour les cas de cancer gastrique non associé à l'EBV, nous avons trouvé une forte corrélation entre la régulation négative des miR-210, miR-34-a et miR-25 et l'expression de la cible correspondante : APC, P53, β-caténine et E-cadhérine, respectivement. En ce qui concerne les cas de cancer gastrique associés à l'EBV, nous avons constaté une diminution globale du score IHC de la β-caténine, la p53 et l'E-cadhérine, corrélée avec une surexpression des miARNs correspondants: miR-34a et miR-25 dans les tissus tumoraux. Tous ces résultats auront un impact important notamment pour le diagnostic précoce car la détection dans le sang de certains miRNA spécifiques refléterait la présence de lésions précancéreuses. D'autre part, plusieurs travaux de recherche sont focalisés sur l'utilisation des miRNAs en thérapie cible du cancer du fait qui sont impliqués dans la régulation de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes.

Cancer du sein

Analyse de l'expression des facteurs de transcription FOX1/FOXA2 et association avec leurs cibles

Notre étude a porté sur 50 biopsies tumorales prélevées de patients tunisiens traités et suivis au CHU Habib Bourguiba de Sfax. L'expression de FOXA1 a été suivie par Q RT-PCR en utilisant l'ARN 28S comme gène de référence. Nos résultats ont montré une surexpression de FOXA1 chez les patientes atteintes de cancer de sein sporadique par rapport aux cas témoins testés, le pourcentage d'expression est de 68%. Par ailleurs, l'étude des corrélations entre l'expression de

la protéine FOXA1 avec les différents paramètres clinico–pathologiques et hormonaux a montré une association significative avec le stade SBR (p=0.019), le récepteur œstrogène (p=0.03) et le statut triple négatif (p=0.002). Ces résultats confirment bien que l'expression de FOXA1 est associée à un comportement agressif de la tumeur.

Cancer du nasopharynx

Marqueurs de prédisposition génétique au NPC

Notre étude de génotypage sur puces Affymetrix « Genome-Wide Human SNP Array 6.0 » a été effectuée pour 7 individus sains et 3 autres atteints de NPC appartenant à la même famille. L'analyse des résultats obtenus a montré seulement une région amplifiée chez tous les individus NPC localisée sur le chromosome X. Cette région a suscité notre intérêt surtout que tous les individus atteints dans cette famille sont des mâles. Le gène couvert par cette région code pour la protocadherin 11 X-linked (PCDH11X) qui selon Cosmic serait oncogénique. Cependant, la vérification de ce résultat par Q-PCR spécifique était non concluante et par conséquent, nous avons conclu qu'il s'agirait plutôt d'un artéfact technique et non d'un marqueur potentiel de prédisposition génétique au NPC. Par ailleurs, notre étude d'association génétique réalisée en absence de contexte familial évident (enquêtes 93 patients NPC et 98 individus témoin) a été focalisée sur 3 SNP à savoir, rs2736100 du gène hTERT, rs4266924 du gène NLRP3 et rs3775291 du gène TLR3. Notre analyse par PCR-hybridation TaqMan a montré des corrélations statistiquement significatives des deux premier SNP avec les cas NPC : génotype rare CC du gène hTERT (p=0.031 ; OR (95%CI) = 2.116 (1.082-4.141) et l'allèle mineur G du gène NLRP3 (p=0.024 ; OR (95%CI) = 1.711 (1.093-2.677). Néanmoins, notre analyse du 3ème SNP rs3775291 du gène TLR3 a montré une association non significative avec la maladie (p=0.917 ; OR (95%CI) = 0.966 (0.642-1.454)).

Etude fonctionnelle du gène TTC40 dans le cancer du nasopharynx :

Après avoir vérifié l'effet de la méthylation sur la répression du gène TTC40 et la présence d'un seul transcrit de taille plus de 8 Kb dans les cellules C666.1, nous avons pu détecter la protéine TTC40 dans les cellules NP69 et Hela par réaction d'immunocytochimie et d'immunofluorescence (anticorps ciblant sa région N-terminal ; Thermo). Le marquage de cette protéine a montré une localisation cytoplasmique, particulièrement dans la région périnucléaire. Dans le cadre de l'investigation fonctionnelle de TTC40, nous avons opté à l'outil d'inhibition de son expression par des siRNAs ciblant son ARNm. Après optimisation des conditions de transfection, nous avons montré par QRT-PCR un taux d'inhibition plus de 85% dans la lignée cellulaire du nasopharyx, NP69. Ce résultat nous a permis de tester par la suite l'effet de l'inhibition de TTC40 sur la viabilité et la migration cellulaires par les tests MTT et scratch, respectivement. Nos résultats préliminaires ont montré que la répression de TTC40 n'a pas affecté la viabilité cellulaire, cependant, il semblait que les cellules transfectées par siRNA-TTC40 migrent plus rapidement que celles transfectées par le siRNA-témoin. Ce résultat suggère une éventuelle implication de TTC40 dans la mobilité cellulaire qui reste à confirmer par d'autres approches moléculaires.

Exploitation de la technique du phage display pour isoler des peptides thérapeutiques

Identification par Phage Display de peptides ciblant l'oncoprotéine LMP1 du virus EBV

Nous avons sélectionné par la technique du Phage Display des peptides qui ciblent l'oncoprotéine virale LMP1. Dans une première partie de notre travail, nous avons synthétisé des

peptides représentant les parties importantes de LMP1, par la suite nous avons criblé par la technique du phage display une banque peptidique pour sélectionner le ou les peptides spécifiques des différentes parties de cette oncoprotéine. Plusieurs peptides candidats ont été sélectionnés et en effectuant des tests d'affinité par des techniques biophysiques comme la spectroscopie RMN ou la titration par calorimétrie isothermique (ou ITC), nous avons pu sélectionner le peptide le plus affin pour LMP1. De plus, ce peptide se fixe spécifiquement sur la première boucle extracellulaire de l'oncoprotéine.Ce peptide B1.12 a été synthétisé et son activité a été testée sur des lignées de cellules HeLa en culture, transfectées ou non par l'oncoprotéine virale. Plusieurs techniques ont été utilisées comme cell-ELISA, le test de compétition, la cytométrie en flux, le test du cycle cellulaire et le western blot. Ces tests nous ont permis de s'assurer de la fixation de notre peptide candidat sur sa cible et de démontrer son efficacité en tant que peptide antagoniste de LMP1.

Phage display sur cellules HeLa exprimant ou pas LMP1

Dans une deuxième partie de notre travail nous avons ciblé l'oncoprotéine LMP1 dans son contexte naturel. De ce fait nous avons effectué le criblage de la banque peptidique directement sur des cellules en culture transfectées ou non par LMP1. Un criblage soustractif a été effectué dans le but d'éliminer les clones spécifiques des cellules qui n'expriment pas l'oncoprotéine LMP1. Le résultat de ce criblage nous a permis de sélectionner plusieurs peptides candidats dont les tests de spécificité et d'activité sont en cours.

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

Notre projet vise à trouver de bons candidats peptidiques pour cibler le $VEGF_{165}$ et moduler son interaction avec le VEGFR-2. Nous avons mis en évidence que les isoformes $VEGF_{121}$ et $VEGF_{165}$ sont surexprimés dans divers types de cancers. Ces deux versions majeures ont été amplifiées par PCR (ainsi que des formes mineures) et ont été clonés dans des vecteurs de la série pET21 et pET22. Une version recombinante de ces facteurs pro-angiogénique est obtenue par l'adoption de diverses procédures visant l'amélioration de la quantité et de la qualité de la protéine produite. La combinaison de plusieurs méthodes d'extraction en particulier la fragilisation des cellules bactériennes par le lysozyme puis leur éclatement par des ultrasons instaurent remarquablement la pureté de l'extrait protéique soluble. En dépit de son expression sous forme soluble, la protéine $VEGF_{165}$ reste essentiellement séquestrée dans des corps d'inclusion (CI) et s'agrège dans un état biologiquement inactif. Une simple procédure de solubilisation et de renaturation des corps d'inclusion fût alors adoptée et a abouti à une exploitation bénéfique des CI. La protéine $VEGF_{165}$ de la fraction soluble et des CI solubilisés est purifiée après une seule étape de chromatographie d'affinité. La protéine résultante est vérifiée par western blot et testée pour sa capacité d'induire la cicatrisation de cellules HUVEC en culture *in vitro* et la néo-formation des vaisseaux en mode *ex vivo*. Cette protéine recombinante est par la suite utilisée pour le criblage de plusieurs banques de peptides aléatoires exprimées à la surface du phage filamenteux M13. La technique du *Phage Display* nous a permis d'identifier de nouvelles séquences peptidiques affines pour la $VEGF_{165}$. Un excellent consensus a été trouvé grâce aux banques Ph.D.-7 et Ph.D.-12 et qui augure d'une exploitation thérapeutique très prometteuse. Nous avons réalisé des screenings de banques de phage display sur trois peptides situés dans les 3 domaines de la protéine P53 suppresseur de tumeur. Ceci

après avoir fait ce même screening sur la protéine totale purifiée depuis la bactérie, en fusion avec GST. L'idée étant de trouver de nouvelles séquences peptidiques reconnaissant spécifiquement les régions choisies de la protéine ; ainsi que pour éviter de travailler avec une protéine exprimée dans la bactérie avec ce que ça présente comme risque de contamination et éviter le problème posé par la présence de la GST.Ainsi et malgré que nombreux des clones de phages obtenus donnent après séquençage des séquences vides ; on a pu obtenir quelques dizaines de séquences nouvelles dont on sait cette fois qu'elles reconnaissent des régions précises de la protéine. Des ELISAs sont faites pour s'en assurer. Ce travail nécessite d'autres investigations car l'un des peptides cibles n'a pas donné de séquences (tous les clones séquencés étaient vides). Par ailleurs, on est revenu à un peptide nommé NG7, isolé auparavant contre la protéine et retrouvé plusieurs fois et ce, afin de tester *in vitro* ses effets possibles. Dans la levure, il semble causer un effet positif sur la croissance (quand il est libre) mais des effets retardateurs de croissance (quand il est biotinylé en N-terminal). Ces effets sont observés par le test des gouttes de dilutions sériées sur milieu solide et ça s'observe pour la levure portant un plasmide vide ou une dose très moyenne de p53. Quand la dose de p53 est importante, l'effet est non décelable. On a entrepris parallèlement des tests du même peptide ainsi que des peptides de p53 servant de cibles pour le phage display, dans la cellule humaine en culture. Ces expériences sont encore à optimiser mais les résultats préliminaires montrent que notre peptide nommé NG7, sous une forme biotinylée, peut avoir deux effets contradictoires selon sa dose. Ceci rejoint un peu ce qu'on a vu dans la levure pour certains tests. Par ailleurs, il semble aussi qu'il y aurait un effet positif de l'un des trois peptides p53 sur la viabilité des cellules humaines.

Isolement et étude de gènes suppresseurs de l'effet apoptotique de p53 chez la levure

Nous avons décidé d'étendre notre approche par la recherche de nouveaux gènes suppresseurs d'apoptose (appelés **GSA**) permettant de restaurer la croissance des cellules de levure $p53^+$ et qui pourraient avoir un rôle dans le déclenchement et la régulation de l'apoptose. Ainsi, nous avons réussi la mise en œuvre d'une approche génétique basée sur un criblage phénotypique fonctionnel des clones porteurs des gènes suppresseurs de l'effet apoptotique de p53 et ceci, après avoir transformé la souche W303/p53 avec une banque « multicopies » de gènes sauvages de levure. Ces gènes appelés GSA contenus dans les clones isolés ont été identifiés suite au séquençage des inserts au niveau de leurs extrémités. Notre approche nous a permis d'obtenir des centaines de clones positifs dont un premier clone a été choisi et analysé afin de valider notre démarche expérimentale. L'analyse bioinformatique des gènes hébergés par l'ADN plasmidique de ce clone a montré que la région contient 3 gènes complets (*YJL 132W*, *YJL 133C-A* et *MRS3*), en plus de deux séquences tronquées des deux gènes distaux. Afin d'identifier le ou les gènes responsable de la suppression, nous avons continué l'étude fonctionnelle de chaque gène cloné et exprimé séparément. Ainsi, l'analyse fonctionnelle des deux gènes (*YJL 132W* et *YJL 133C-A*) séparément, a montré l'absence du phénotype suppresseur. Cependant, nous sommes en cours de réaliser l'étude fonctionnelle du troisième gène (*MRS3*) et vérifier son effet suppresseur puisque c'est le dernier candidat, avec l'objectif ultime d'identifier son orthologue dans le génome humain et étudier son effet dans les cellules humaines en culture et voir si ce gène est aussi impliqué dans la mort cellulaire chez les mammifères. Il est utile de noter que le gène MRS3 (Mitochndrial RNA Splicing 3) est un gène codant pour une protéine mitochondriale impliquée dans la maturation des ARNprem

mitochondriaux. Il a été rapporté que l'élévation du nombre de copies de ce gène permettait de supprimer des mutations mitochondriales localisées dans les introns.

Molécules à pouvoir thrombotiques et anti-thrombotiques :

Ce projet vise l'identification de molécules à potentialités thrombotiques ou anti-thrombotiques à partir d'une collection de molécules chimiques. Les travaux sont déjà initiés dans notre laboratoire, en collaboration avec la faculté de médecine de Sfax, et nous avons identifié quatre molécules à pouvoir anti-agrégant et une molécule pro-agrégante. Nos objectifs ultérieurs se sont focalisés sur l'étude de la cytotoxicité de ces molécules, leur effet sur la viabilité plaquettaire et sur l'adhésion des plaquettes à une surface thrombogénique. Nous avons choisi de poursuivre nos études sur deux molécules anti-agrégantes et la molécule pro-agrégante. La cytotoxicité a été évaluée sur deux lignées cellulaires HeLa (carcinome cervical humain) et B16F10 (mélanome de souris). Les résultats obtenus montrent qu'aucune molécule n'est douée d'un pouvoir cytotoxique sur les deux lignées testées avec les concentrations donnant l'effet biologique souhaité. La viabilité plaquettaire a été évaluée en mesurant l'activité acide phosphatase intra-plaquettaire. Nous avons montré que les trois molécules ne présentent pas d'effet sur la viabilité des plaquettes à l'exception d'une seule molécule mais à forte concentration (10 mM). L'effet des trois molécules sur l'adhésion des plaquettes sur une surface thrombogénique de collagène a été évalué. Nous avons montré que les deux molécules anti-agrégantes n'ont pas d'effet inhibiteur sur l'adhésion aux concentrations d'inhibition de l'agrégation plaquettaire par contre la molécule pro-agrégante exerce un effet amplificateur de l'adhésion, ce qui supporte son pouvoir agrégant. L'absence d'effet cytotoxique aussi bien sur les lignées cellulaires que sur les plaquettes nous encourage d'avancer dans l'exploration de ces molécules.

Production scientifique et diplômanteet Ouverture sur l'environnement

I. Publication Parues ou sous presse

1) **Mallek-Fakhfakh H, Belghith H.** Physicochemical properties of thermotolerant extracellular β-glucosidase from Talaromyces thermophilus and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. ***Carbohydr Res. 2016 doi: 10.1016/j.carres.2015.10.014.***
2) **Abdelmaksoud-Dammak R, 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. 2016 doi: 10.1007/s13277-015-3902-4.***
3) **Benhmad I, Boudabbous M, Yaîch A, Rebai M, Gargouri A.**A novel neutral, halophile Stachybotrys microspora-based endoglucanase active impact on β-glucan. ***Bioprocess Biosyst Eng. 2016 doi: 10.1007/s00449-016-1549-1.***
4) **Dabbeche-Bouricha E, Hadiji-Abbes N, Abdelmaksoud-Damak R, Alaya N, Ayadi W, Charfi S, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Mokdad-Gargouri R.** Quantitative measurement of iNOS expression in melanoma, nasopharyngeal, colorectal, and breast tumors of Tunisian patients: comparative study and clinical significance.***Tumour Biol. 2016 doi: 10.1007/s13277-015-4303-4. Epub 2015 Nov 7.***
5) **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 occitanis and use in juice clarification. ***of Molecular Catalysis B: Enzymatic Volume 127, May 2016, Pages 56–66***

6) **Boudabbous M, Saibi W, Bouallagui Z, Dardouri M, Sayadi S, Belghith H, Mechichi T, Gargouri A.**Fast activated charcoal prepurification of Fusarium solani β-glucosidase for an efficient oleuropein bioconversion.***Prep Biochem Biotechnol. 2016 Jun 24:1-7.***
7) **Ben Ayed-Guerfali D, Charfi S, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R.**Clinical and prognosis relevance of COX-2 expression in Tunisian patients with primary gastric adenocarcinoma.***Cancer Biomark. 2016. doi: 10.3233/CBM-160618.***
8) **Kaouthar F, Ameny FK, Yosra K, Walid S, Ali G, Faiçal B.** Responses of transgenic Arabidopsis plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses.***J Plant Physiol. Epub 2016 Apr 28.***
9) **Ayadi I, Kamoun O, Trigui-Lahiani H, Hdiji A, Gargouri A, Belghith H, Guerfali M.** Single cell oil production from a newly isolated Candida viswanathii Y-E4 and agro-industrial by-products valorization.***J Ind Microbiol Biotechnol. 2016 doi: 10.1007/s10295-016-1772-4. .***
10) **Aydi R, Gara AB, Chaaben R, Saad HB, Fki L, ElFeki A, Belghith H, Belghith K, Kammoun M.**Hypolipidemic effect of dihydroisoquinoline oxaziridine in high-fat diet-fed rats.***Biomed Pharmacother. 2016 doi: 10.1016/j.biopha.2016.06.003. Epub 2016 Jun 13.***
11) **Hadj Sassi A, Tounsi H, Trigui-Lahiani H, Bouzouita R, Ben Romdhane Z, Gargouri A.** A low-temperature polygalacturonase from P. occitanis: characterization and application in juice clarification. ***Int J Biol Macromol. 2016 doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.075. .***
12) **Kolsi RB, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, Blecker C, Allouche N, Belghith H, Belghith K.**Structural characterization and functional properties of antihypertensive Cymodocea nodosa sulfated polysaccharide.***Carbohydr Polym. 2016***
13) **Mallek-Fakhfakh H, Fakhfakh J, Masmoudi N, Rezgui F, Gargouri A, Belghith H.**Agricultural Wastes as Substrates for β-glucosidases Production by *Talaromyces thermophi**lus*: **Role of** These Enzymes in Enhancing Waste Paper Saccharification.***Prep Biochem Biotechnol. 2016 Nov 8. [Epub ahead of print]***
14) **Hadj Sassi A, Trigui-Lahiani H, Abdeljalil S, Gargouri A.**Enhancement of solubility, purification and inclusion-bodies-refolding of an active pectin lyase from *Penicillium* ***occitanis*** e**xp**ressed in Escherichia coli.***Int J Biol Macromol. 2016 Nov 11.***
15) **Ammous-Boukhris N, Mosbah A, Sahli E, Ayadi *W*, Hadhri-Guiga B, Chérif A, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R.**Phage-display screening identifies LMP1-binding peptides targeting the C-terminus region of the EB***V oncopro**tein.Peptides. 2016 Nov;85:73-79.***
16) **Ben Gara A, Ben Abdallah Kolsi R, Jardak N, Chaaben R, El-Feki A, Fki L, Belghith H, Belghith K. Inhibitory a**ctivities of *Cystoseira crinita* sulfated polysaccharide on key enzymes related to diabetes and hyp***ertension***: ***in vitro and animal study. Arch Physiol Biochem. 2016 Nov 18:1-12. [Epub ahead of print]***
17) **Ines Borgi, Jean-William Dupuy, Imen Blibech, Delphine Lapaillerie, Anne-Marie Lomenech, Ahmed Rebai, Mohieddine Ksantini, Marc Bonneu, Ali Gargouri.**Hyper-proteolytic mu**tant of Beauveria ba**ssi**ana, a new biological control agent against the tomato borer. ***Agron. Sustain. Dev. (2016) 36:60 DOI 10.1007/s13593-016-0394-6.***
18) **I. Borgi, A. Gargouri.** A Novel High Molecular Weight Thermo-Acidoactive β-Glucosidase from *Beauveria bassiana*.***Applied Biochemistry and Microbiology, 2016, 52(6). 602–607.***
19) **Samia Azabou, Yousra Abid, Haifa Sebii, Imen 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 68 (2016), 280-287.***
20) **Mkaouar H, Akermi N, Mariaule V, Szukala F, Boudebbouze S, Gaci N, Pons N, Marquez J, Gargouri A, Maguin E, Rhimi M.**Siropins, novel serine protease inhibitors from gut microbiota acting on human proteases involved in inflammatory bowel diseases.***Microb Cell Factories 2016 [Epub ahead of print].***
21) **Feki K, Farhat-Khemakhem A, Kamoun Y, Saibi W, Gargouri A, Brini F.**Responses of transgenic Arabidopsis plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses. ***J Plant Physiol. 198 (2016):56-68.***
22) **Saoussen Debouki-Joudi, FatmaTrifa, Abdelmajid Khabir, Tahia Sellami-Boudawara, Mounir Frikha, jamel Daoud and Raja Mokdad-Gargouri.**CpG methylation ofAPC promoter 1A in sporadic and familial breast cancer patients.***Cancer Biomarkers 2016 Dec 2.***

23) **Boudabbous M, Ben Hmad I, Saibi W, Mssawra M, Belghith H, Gargouri A.**Trans-glycosylation capacity of a highly glycosylated multi-specific β-glucosidase from Fusarium solani.*Bioprocess Biosyst Eng.* ***2016 Dec 17. [Epub ahead of print]***

II. BREVETS D'INVENTION DEPOSES EN 2016 :

1. **Dorra Ben Ayed-Guerfali, Wajdi Ayadi, Abdelmajid Khabir, Tahia Sellami-Boudawara,Ali Gargouri, et Raja Mokdad-Gargouri:**Etude de la prévalence et du polymorphisme génétique du virus d'epstein barr dans les adénocarcinomes gastriques du sud tunisien. **(Déposé à l'INNORPI sous le N° TN 2016/0520, 18 Novembre 2016).**
2. **Awatef Taktak et Ali Gargouri :**Isolement de nouvelles séquences peptidiques anti-vegf pour le ciblage de l'angiogenese.**(Déposé à l'INNORPI sous le N° TN 2017/0049 , 22Février 2017).**
3. **Ines Ben Hmad et Ali Gargouri.:** Nouveau améliorant de panification impliquant l'ajout d'un cocktail enzymatique d'une souche fongique locale Stachybotrys microspora à la farine.**(Déposé à l'INNORPI sous le N° TN 2017/0055, 22Février 2017).**

III. Diplômes

III.1. Thèses

1. **Ines Borgi:**Beauveria bassiana : étude des enzymes extracellulaires et application dans le bio-contrôle de Tuta absoluta. ***27 juillet 2016. (FSS).*****(Encadreur : Ali Gargouri).**
2. **Lobna MAALEJ-SIALA:**Etude moléculaire et épidémiologique des thrombophilies constitutionnelles chez une population du sud Tunisien. ***27 Septembre 2016. (FSS)*** **(Encadreur : Jalel Gargouri & Ali Gargouri).**
3. **Manel Boudabbous Ben Amor:**Production, purification et applications d'une β-glucosidase hyperglycosylée de Fusarium solani. ***12 Novembre 2016. (ENIS).*****(Encadreur :Ali Gargouri).**
4. **Hanen Mallek FAKHFAKH:**Valorisation de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et Etude biochimique d'une β-glucosidase de *Talaromyces thermophilus*. ***17 novembre 2016. (FSS).*****(Encadreur : Hafedh Belghith).**
5. **Nihel AMMOUS-BOUKHRIS:**Identification par Phage Display de peptides ciblant l'oncoprotéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr. ***29/11/2016. (ENIS).*** **(Encadreur :Raja Mokdad-Gargouri).**
6. **Azza HADJ SASSI:**Etude moléculaire et biochimique de pectinases de la souche mutante CT1 de*Penicillium occitanis.* ***17 Décembre 2016. (ENIS).*** **(Encadreur : Ali Gargouri).**
7. **Hajer TOUNSI KARRAY:**Etude Biochimique et Moléculaire de pectinases fongiques du mutant CT1 et leur application dans l'industrie oléicole. ***23 Décembre 2016. (ENIS).*** **(Encadreur : Ali Gargouri).**

III.2. Mastères de recherche12/07/2016

1. **Nour Chamtouri:**Analyse de l'expression de mir 10a et de ses cibles dans le cancer colorectal.***Soutenue le 12Juillet 2017. (Faculté des Sciences de Sfax).*** **(Encadreur : Pr. Raja Mokdad-Gargouri & Dr. Rania Abdelmaksoud-Dammak).**

III.3. Projets de Fin d'étude

1. **Chiraz Essid:**Cytotoxicité et effets sur la viabilité et l'adhésion plaquettaire de nouvelles molécules à potentialités thrombotiques ou anti thrombotiques.***Soutenue le 31Mai 2016. (Faculté des sciences de Gafsa).*** **(Encadreur : Dr. Basma HadjKacem).**

IV- Projets de coopération internationaux

1. Projet de recherche dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso – Française (PHC-Utique) (Année 2016) intitulé **« Connexion RIP 140 et voie Wnt/ Bêta-caténine identification de marqueurs dans les cancers gastro-intestinaux »** et sous le code **16G 0805.**
2. Renouvellement du Projet Tuniso-Français (PHC-Utique) (An**née 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)

مخبـرالمبيدات البيولوجية

Responsable : Pr.slim TOUNSI

Email : slim.tounsi@cbs.rnrt.tn

LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	Grade	Nom et Prénom Etudiants	Grade
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	Ibtissem Saidi	Doctorant
Jihen Elleuch	Ass-Contractuel, FSS	Maryem Soudeni Rim Miladi	Mastère de recherche
Hanen Boukédi	Post-Doc	Jihen Mseddi Zohra Benkhoud	Mastère de recherche
Saoussen Ben Khedr	Post-Doc	Ahlem Ammar Karima Khadraoui Hedia Salem	Mastère de recherche
Dalel Ben Farhat	Post-Doc		

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

BJECTIFS 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

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Projet 1: Etude et production de bioinsecticides d'origines microbienne et végétale

1- Bioinsecticides actifs contre les diptères

1-1- Recherche de souches actives contre la cératite (mouche méditerranéenne des fruits).

La présente étude a été entreprise pour isoler et sélectionner des souches d'actinomycètes, isolées de divers habitats (sols, rhizosphère, plantes), et ayant une activité insecticide contre les adultes de l'insecte ravageur *C. capitata*. Suite à la caractérisation morphologique, 186 souches ont été regroupées en 28 groupes. Les isolats O2.44, O2.B, P6.1 et O2.40 ont manifesté une activité antibactérienne importante contre les 2 pathogènes *S. aureus* et *A. tumefaciens*. Un criblage biologique primaire a été réalisé contre les adultes de *Drosophila melanogaster*, utilisés comme un modèle pour le dépistage biologique de l'activité insecticide. Les résultats préliminaires ont montré que deux souches, P6.1 et O2.42 appartenant à des groupes différents d'actinomycètes, ont révélé une activité insecticide contre la drosophile avec une mortalité de 37,5% et 22,5% respectivement. Ces souches pourraient ainsi contribuer à l'élaboration d'un nouvel bioinsecticide intégrant la lutte biologique contre la cératite pour limiter les pertes économiques et favoriser la protection de l'environnement.

1-2- Séquençage et annotation du génome de la souche BLB406 de *Bacillus thuringiensis*

Le génome de la souche de *B. thuringiensis* BLB406 a été séquencé en utilisant la plate-forme Illumina (MiSeq / HiSeq-CBS). Les séquences obtenues ont été assemblées dans des contigs. L'analyse a été réalisée à l'aide de la méthodologie d' « assemblage de novo ». Nous avons collecté un total de 244 contigs composés d'un nombre de nucléotides allant de 181 nucléotides à 346298 nucléotides. La taille totale des contigs est 5.963.981 pb. L'Annotation du génome de BLB406 a été faite en utilisant l'outil RAST puis par l'outil d'annotation de PGAP (*NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) de NCBI. La séquence du génome BLB406 a été déposée dans la base de données DDBJ/ENA/Genbank.

1-3- Etude comparative, *in silico*, de BLB406 avec les sous-espèces apparentées de *B. thuringiensis*

À partir de la séquence obtenue du génome de la souche BLB406 de *B. thuringiensis*, les séquences codant pour des protéines ont été prédites et extraites par le système d'annotation PGAP. Les séquences génomiques de BLB406 ont été comparées aux séquences génomiques de 12 souches de Bt apparentées à savoir : Al-Hakam, YBT, Bt407, HD789, MC28, IS5056, serovar *chinensis*, serovar *konkukian*, serovar *finitimus*, HD771, BMB171 et serovar *kurstaki*. Cette comparaison a été effectuée avec l'outil BRIG (*Blast Ring Image Generator*). BLB406 a présenté un grand degré de parenté à la sous espèce *kurstaki* (figure 1). La comparaison a été effectuée en utilisant les outils Inparanoid (http://InParanoid.sbc.su.se) puis MultiParanoid (http://multiparanoid.cgb.ki.se/) pour identifier le groupe de gènes orthologues entre toutes les espèces. Cette comparaison a montré que la souche BLB406 est unique dans son contenu en protéines insecticides. C'est une souche très prometteuse dans le domaine des bioinsecticides.

1-4- Identification des gènes codant des activités insecticides chez la souche BLB406

Vu l'originalité de la souche BLB406 mise en évidence par les profils protéique et plasmidique, nous nous sommes proposés d'identifier les gènes codant ses protéines insecticides. Ainsi, nous avons utilisé la combinaison de l'outil Bt Toxin_scanner disponible via (http://bcam.hzaubmb.org/BtToxin_scanner/) et du Blastp pour la comparaison du protéome de BLB406 et des séquences protéiques de Bt-Toxins connues. Les résultats obtenus ont montré que le génome de BLB406 héberge une panoplie de gènes codant pour des protéines à activités larvicides Tableau 1.

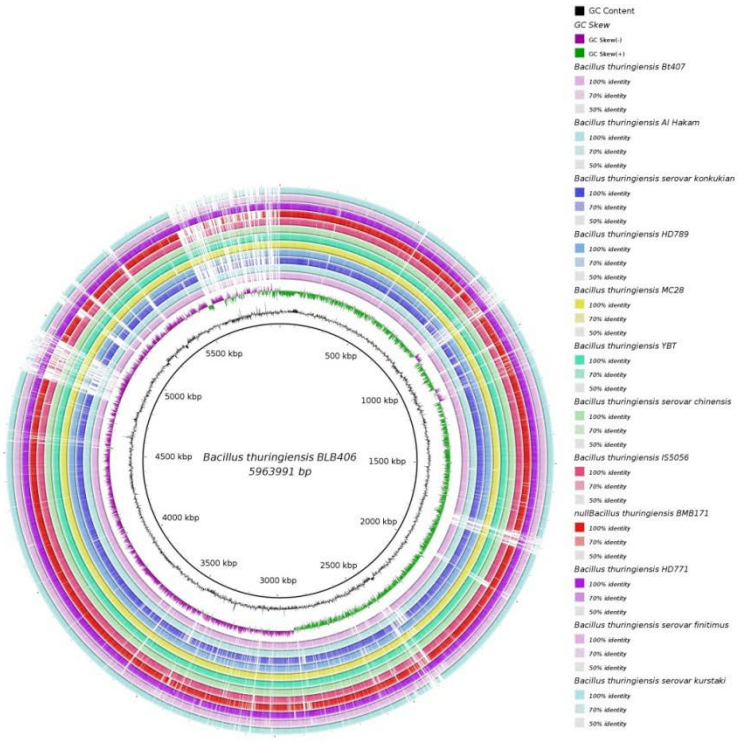


Figure 1: Comparaison du génome de BLB406 avec des espèces de *Bacillus thuringiensis* apparentées en utilisant BRIG.

Tableau 1: Caractéristiques des gènes codant les toxines de la souche BLB406.

Nom du gène identifié chez BLB406	Cadre ouvert de lecture (pb)	Taille de la protéine (aa)	Poids Moléculaire (kDa)
cry11A BLB406 : *BTW32_15410*	1998	665	75,70
cry22Aa BLB406 : *WT32_25980*	2169	721	79,04
cry2A BLB406 : *BWT32_29820*	1936	645	73,64
cry60B BLB406 : *BWT32_25795*	894	297	33,41
cry64A BLB406 : *BWT32_09760*	864	287	32,05
vip4(a) BLB406 : *BWT32_09840*	2961	986	110,43
vip4(b) BLB406 : *BWT32_26050*	2930	976	109,73

2- Bioinsecticides actifs contre les lépidoptères :

2-1- Criblage des isolats pour la présence d'un gène de type *cry1E*

Dans le but de tester la présence du gène *cry1E*, un criblage par PCR sur les ADN de 80 isolats a été réalisé. Aucune amplification n'a été obtenue pour 75 % des isolats. Ce qui n'est pas surprenant vue la rareté de ces gènes par rapport aux autres gènes *cry* chez *B.*

thuringiensis. Par ailleurs, trois isolats seulement ont donné des amplifications ; il s'agit des isolats BLB350, BUPM14 et BUPM104. Dans une première étape, nous avons cloné les fragments internes des gènes *cry1E* de ces trois isolats. Après vérification de la réussite du clonage dans le vecteur pGEM-T par PCR et par digestion enzymatique une détermination de la séquence nucléotidique des fragments PCR issus des trois isolats est en cours.

2-2- Mise au point d'un milieu de culture économique pour la production de bioinsecticides par fermentation en milieu solide

Dans le cadre de la mise au point d'un milieu de culture économique pouvant soutenir la croissance de *B. thuringiensis*, sa sporulation et sa production de δ-endotoxines par fermentation en milieu solide, nous avons montré que le son d'orge permet d'obtenir le meilleur rendement de production de l'ordre de 3,4 mg/g de substrat. La caractérisation du son d'orge a montré qu'il contient des éléments pouvant soutenir la croissance et la sporulation de la souche BLB1 de *B. thuringiensis kurstaki*. Entre eux se trouve le carbone (1827 mg/l), l'azote (1,72%), les éléments minéraux comme le calcium, le magnésium et divers ions métalliques qui sont nécessaires pour le développement de la bactérie. Par la suite, nous avons montré que la production de δ-endotoxines est fortement influencée par la concentration du substrat, la densité optique initiale ainsi que la température d'incubation. La comparaison de la fermentation en milieu solide et celle en milieu liquide, a montré que la fermentation solide permet d'avoir un rendement de production de δ-endotoxines nettement plus élevé tout en maintenant la même toxicité du bioinsecticide.

2-3- 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*.

2-4- Effet synergique entre le biosurfactant de *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 et la toxine Vip3Aa16 de *Bacillus thuringiensis* contre les larves de *Spodoptera littoralis*

L'activité insecticide du biosurfactant AG1 a été testée contre les larves de *S. littoralis*. Le résultat obtenu montre l'effet toxique et létal du biosurfactant issu de *B. amyloliquefaciens* AG1 sur *S. littoralis* avec une CL50 égale à 245 ng/cm^2. Des coupes histologiques réalisées au niveau de l'intestin de *S. littoralis* ayant ingérés le biosurfactant AG1 ont montré une vacuolisation intense, une production de vésicules et une lyse des cellules de l'épithélium intestinal. PAR ligand blot, nous avons montré que le biosurfactant AG1 reconnait trois récepteurs intestinaux de tailles respectives 91, 72 and 64 kDa, au niveau des BBMVs de *S. littoralis*. Par ailleurs, nous avons noté un effet synergique entre le biosurfactant AG1 et Vip3Aa16 contre *S. littoralis*. Ceci montre que le biosurfactant produit par *B. amyloliquefaciens* AG1 pourrait être un agent de lutte biologique prometteur afin de contrôler *S. littoralis* et prévenir le phénomène de la résistance des insectes aux bioinsecticides.

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

1-Protection de la tomate contre la verticilliose

Un criblage basée sur l'aptitude de souches bactériennes, appartenant au genre Bacillus, à produire des métabolites pouvant être impliqués dans la protection des plantes et l'amélioration de leurs croissance a montré que la souche C2 de *Bacillus amyloliquefaciens* possède le potentiel le plus intéressant pour être utilisée comme un agent anti-fongique contre *Verticilium dahliae*. Par la suite, nous avons évalué l'aptitude de C2 à promouvoir la croissance de la tomate et la protéger contre la Verticilliose, *in vivo*. Les résultats obtenus ont montré que l'application de la souche C2, avec une concentration de 10^8 CFU/ml, a engendré une réduction significative de la maladie chez les plantes infectées par la souche V30 de *Verticilium dahliae*, l'agent causal de la verticiliose. D'autre part, en présence du pathogène, la souche C2 a engendré une amélioration significative sur tous les paramètres de croissance par rapport aux plantes non traitées. Ces résultats montrent que la souche C2 peut être utilisée comme un agent de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes.

2- CEIZ-11 : une souche prometteuse de *Bacillus amyloliquefaciens* :

La capacité de la souche CEIZ-11 à produire ces biomolécules antifongiques a été mise en évidence par chromatographie en phase inverse suivie par des analyses de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC (LC-MS). L'analyse de ces données a permis de détecter 3 homologues de l'iturine A, une fengycine et une surfactine. Ces métabolites ont montré une activité antifongique importante contre une panoplie de champignons phytopathogènes avec des valeurs de CMI comprise entre 9,8 et 156 µg/ml, une haute résistance à une large gamme de pH et de température. D'autre part, grâce à un criblage préliminaire pour définir les sources de carbone et d'azote appropriées, suivi par une application de la méthodologie de surface de réponse (RSM) nous avons montré que l'extrait de pomme de terre et le tourteau de soja, en tant que sources de carbone et d'azote complexes, sont très efficace pour produire les composés antifongiques de CEIZ-11.De même, nous avons montré que la souche CEIZ-11 protégeait, de manière évidente, la plante bactérisée contre l'agent responsable de la fonte des semis, *Phytophtora aphanidermatum*.

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

1-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 ses effets bénéfiques sur les plantes par des tests *in vitro* suivies d'une confirmation *in vivo*. Les effets bénéfiques incluent la colonisation efficace des racines, la promotion de la croissance des plantes de tomate et le biocontrôle de la maladie de la galle du collet. La caractérisation *in vitro*, des différents traits de la souche 32a impliqués dans ses effets bénéfiques directs et indirects sur les plantes, nous a permis de suggérer l'activité biofertilisante et de biocontrôle de cette souche par l'apport d'éléments nutritifs à la plante et la sécrétion de divers composés antimicrobiens. Dans les tests de confirmation menés *in vivo*, une efficacité plus importante des spores de la souche 32a par rapport aux cellules végétatives a été remarquée. Lors de l'interaction avec les plantes de tomate, cette forme a montré une colonisation intensive et stable des surfaces racinaires, qui a favorisé sa présence dans les différents tissus internes des plantes avec des densités bactériennes importantes.

Grâce à ce niveau de colonisation élevé, des effets positifs sur la croissance des plantes de tomate ont été obtenus. Des améliorations significatives de la germination et des différents paramètres de croissance des plantes ont été notées pour les lots traités par la souche 32a par rapport aux lots témoins non traités. Quant au biocontrôle de la maladie de la galle du collet, une réduction des symptômes causés par les souches d'*A. tumefaciens* C58 et B6 a été obtenue après traitement des plantes de tomate aussi bien avec les spores qu'avec les cellules végétatives de la souche 32a.

2-Etude des activités antibactériennes de la plante *Emex spinosa*

Nous avons réalisé un screening phytochimique quantitatif et qualitatif des différents extraits organiques de la plante ainsi que l'étude de leurs pouvoirs antibactériens *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que l'extrait à l'acétate d'éthyle possède la teneur la plus élevée en polyphénols et en flavonoïdes. L'extrait à l'acétate d'éthyle d'*Emex spinosa* a montré une activité antibactérienne, contre les souches Gram+ et Gram-, supérieure à celle de la streptomycine et du chloramphénicol. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont très faibles pour le chloramphénicol et la kanamycine. La combinaison des deux agents antibactériens (extrait et antibiotique) selon la méthode de Checkerboard nous a permis de constater que la meilleure activité synergique a été obtenue ave la kanamycine qui a réduit la CMI de cet antibiotique de 16,625 µg/ml à 2 µg/ml (soit 1/8 la CMI). L'ensemble de ces résultats suggèrent l'utilisation de la partie aérienne de l'épine du diable, en combinaison avec un antibiotique sur une souche résistante permettrait d'évaluer leur pouvoir de réversion de la résistance à l'antibiothérapie.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications Internationales de 2016

1- Elleuch J, Jaoua S, Ginibre C, Chandre F, Tounsi S et Zghal R Z **(2016)** Toxin stability improvement and toxicity increase against dipteran and lepidopteran larvae of *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry2Aa. *Pest Manag. Sci. doi:10.1002/ps.4261*.

2- Boulila S, Oudadesse H, Elfeki H, Kallel R, Lefeuvre B, Mabrouk M, Tounsi S, Mhalla D, Mostafa A et Chaabouni K **(2016)** Antibacterial and in vivo reactivity of bioactive glass and poly (vinyl alcohol) composites prepared by melting and sol-gel techniques. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 33(5): 1659-1668.

3- Boukedi H, Tounsi S et Abdelkefi-Mesrati L **(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.* 123(2): 59-64.

4- Boukedi H, Sellami S, Ktari S, Sellami-Boudawara T, Tounsi S et Abdelkefi-Mesrati L (**2016**) Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. *Microbiological Research*. 186: 9-15.

5- Bouaziz A, Mhalla D, Zouari I, Jlaiel L, Tounsi S, Jarraya R et Trigui M (2016) Antibacterial and antioxidant activities of *Hammada scoparia* extracts and its major purified alkaloids. South African Journal of Botany. 105: 89-96.

6- BenFarhat-Touzri D, Driss F etTounsi S **(2016)** A promising HD133-like strain of *Bacillus thuringiensis* with dual efficiency to the two Lepidopteran pests: Spodoptera littoralis (Noctuidae) and Ephestia kuehniella (Pyralidae). Toxicon. 118: 112-120.

7- Dammak M, Khedher S B, Boukedi H, Chaib I, Laarif A et Tounsi S **(2016)** Involvement of the processing step in the susceptibility/tolerance of two lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 46-50.

8- Ennouri K, Hassen H B et Zouari N **(2016)** Statistical Analysis of Cultural Parameters Influencing Delta-Endotoxins and Proteases Productions by *Bacillus thuringiensis kurstaki*. *Arabian Journal for Science and Engineering.* 4: 1-8.

9- Frikha-Gargouri O, Ben Abdallah D, Ghorbel I, Charfeddine I, Jlaiel L, Triki M et Tounsi S **(2016)** Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress Agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. *Pest Manag Sci*. doi: 10.1002/ps.4331.

10- Kilani-Feki O, Khedher S B, Dammak M, Kamoun A, Daami-Remadi M et Tounsi S **(2016)** Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control*. 73-82.

11- Sellami S et Jamoussi K **(2016)** Investigation of larvae digestive β-glucosidase and proteases of the tomato pest *Tuta absoluta* for inhibiting the insect development. *Bulletin of entomological research*. 1-9

12- Sellami S, Jemli S, Abdelmalek N, Dabbéche E et Jamoussi K (**2016**) Localization and in silico study of the vegetative insecticidal proteins Vip2S-Vip1S of *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*

13- Jihen Elleuch, Samir Jaoua, Slim Tounsi, Raida Zribi Zghal **(2016)** Cry1Ac toxicity enhancement towards lepidopteran pest *Ephestia kuehniella* through its protection against excessive proteolysis. Toxicon 120: 42-48.

14- Raida Zribi Zghal, Jihen Elleuch, Mamdouh BEN ALI, Frédéric DARRIET, Ahmed Rebai, Fabrice Chandre, Samir Jaoua and Slim Tounsi **(2016)**. Towards novel Cry toxins with enhanced toxicity/broader: a new chimeric Cry4Ba / Cry1Ac toxin. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. DOI 10.1007/s00253-016-7766-3.

15- Zalila-Kolsi, I., Ben Mahmoud, A., Ali, H., Sellami, S., Nasfi, Z., Tounsi, S., Jamoussi, K. **(2016)**. Antagonist effects of Bacillus spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat. *Microbiol. Res.* 192, 148-158.

16- 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*. 56, 654-661.

17- Gharsallah H, Bom RJ, Bruisten SM, Himschoot M, Frikha-Gargouri O, Hammami A. (2016) Identification of a dominant *Chlamydia trachomatis* strain in patients attending sexual transmitted infection clinic and female sex workers in Tunisia using a high resolution typing method. *Infect Genet* Evol. Oct;44:444-9.

18- Nouha Abdelmalek, Sameh Sellami, Mireille Kallassy-Awad, Molka Feki Tounsi, Abdelkrim Mebarkia, Slim Tounsi, Souad Rouis **(2016)** Influence of *Ephestia kuehniella* stage larvae on the potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa delta-endotoxin. Pest Manag Sci. 72:913-21.

19- Maissa Chakroun, Sameh Sellami, Juan Ferré, Slim Tounsi, Souad Rouis (2016) Ephestia kuehniella tolerance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa is associated with reduced oligomer formation. *Biochemical and Biophysical Research* Communications 482:808-813.

20- Najwa Benfradj, Slim Tounsi and Naïma Boughalleb-M'Hamdi (**2016)** In-vitro Evaluation of Antagonists and Fungicides in Controlling Citrus Gummosis Caused by Phytophthora, Phytopythium and Pythium species in Tunisia. *British Microbiology Research Journal* 16: 1-14.

BREVET:

Titre: Utilisation d'un mélange de lipopeptides comme une nouvelle forme de biopesticide efficace dans la lutte contre la maladie de la galle du collet. **TN2016/0378**.
INVENTEURS : Ben Abdallah D, Frikha-Gargouri O, Tounsi S.

FORMATION DIPLOMANTE

Thèses

1. Hanen Boukédi : Les toxines Vip de *Bacillus thuringiensis* : Etude moléculaire, Histhopathologie et mode d'action. DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, **soutenue le 25-01-2016**. Directeur de Thèse : Pr Slim Tounsi, Encadreur : Dr. Lobna Abdelkéfi.
2. Imen Zalila-Kolsi : "Etude et valorisation des biofongicides de *Bacillus* spp. contre les champignons phytopathogènes. DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, **soutenance prévue le 17 Décembre 2016**. Directeur de Thèse : Pr Slim Tounsi, Encadreur : Dr. Kaïs Jamoussi.
3. Dhekra Mhalla : Caractérisation phytochimique et potentialités biologiques de trois plantes endémiques Rumex tingitanus, Corchorus olitorius et Hammada scoparia. Doctorat en « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, **soutenance prévue en Décembre 2016**. Directeur de Thèse : Mohamed Trigui.
4. Imen Zouari : « Etude des potentialités de l'extrait de compost CE1 et de la souche CEIZ-11 de *Bacillus amyloliquefaciens* pour le biocontrôle des champignons phytopathogènes » DOCTORAT dans la discipline « Génie Biologique Biologiques » de l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, **soutenance prévue en Décembre 2016**. Directeur de Thèse : Pr Slim Tounsi, Encadreur : Dr. Mohamed Trigui.
5. Dorra Ben Abdallah : « Contrôle biologique de la maladie de la galle du collet par la souche 32a de *Bacillus amyloliquefaciens* et étude des mécanismes de biocontrôle impliqués » DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, **soutenance prévue le 9 Décembre 2016**. Directeur de Thèse : Pr Slim Tounsi, Encadreur : Dr. Olfa Frikha.

Mastères de recherche

1. Ahlem Ammar: Sujet : Recherche de souches (genre actinomycètes) actives contre la cératite (mouche méditerranéenne des fruits). Faculté des Sciences et Techniques Université du Maine – Le Mans. Encadreur : Souad Rouis. **Soutenue en Juin 2016**
2. Jihen Mseddi : Sujet : Caractérisation de souches de *Bacillus thuringiensis* et de champignon entomopathogènes actives contre la noctuelle *Spodoptera littoralis*. Encadreur : Hichem Azzouz - **Soutenue en Novembre 2016, FSS**
3. Hedia Salem : Sujet : « Optimisation de la production des biopesticides à base de *Bacillus thuringiensis* par fermentation en milieu solide». Encadreur Wafa Jallouli. **Soutenue en décembre 2016, FSS**
4. Karima KHADRAOUI : Sujet : « Investigation des enzymes digestives de Spodoptera littoralis ». Encadreur : Kaïs Jamoussi. **Soutenue en décembre 2016, FSS**
5. Mariam Soudani : Sujet : « Etude de la synergie d'action des facteurs de virulences sécrétées par Bacillus thuringiensis ». Encadreur : Slim Tounsi. **Soutenue en décembre 2016, FSS**

6. Rim Miladi : Sujet : « Etude de la synergie d'action de facteurs de virulence de *Bacillus thuringiensis* et de nématode. Encadreur Fatma Driss. **Soutenue en décembre 2016, FSS**
7. Zohra Benkhoud : Sujet : «Investigation des activités antibactériennes de souches de *Bacillus* sp. et de souches épiphytiques contre *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien». Encadreur : Olfa Frikha. **Soutenue en décembre 2016, FSS**

OBTENTION DE PRIX

Krama Zouari : Prix du concours des meilleurs projets innovants en Biotechnologie de la santé (2016) organisé par Association de Développement de la Recherche, de l'Innovation et de l'Insertion des Compétences (ADRIC).

PROJETS ACCEPTES :

- 1er projet, intitulé: " STomP: Sustainable Tomato Production: plant defense enhancement, development of new biopesticides and optimization of environmental, water and chemical inputs (2016 – 2019)": Nom du bailleur de fonds**, ARIMnet 2 (FSS-CBS)**.
L'objectif du projet est d'assurer une production durable en tomate via l'amélioration l'étude du système de défense de la tomate, la mise au point de nouveaux bioinsecticides et l'optimisation de l'irrigation et l'utilisation de fertilisants chimiques.
- 2ème projet, intitulé: Development of microbial agents for control of plant diseases and insect pests. Nom du bailleur de fonds: Coopération **TUN-GER.**
L'objectif du projet et la mise au point de nouveaux biopesticides utilisables dans la protection des plantes contre les maladies fongiques et les insectes.
- 3ème projet, intitulé: Development of biological control strategies to protect apple and pear against fire blight (2016-2017): **COMSTECH-TWAS** Joint Research Grants Program .
L'objectif du projet est de rechercher des agents de lutte biologique contre l'agent causal du feu bactérien, *Erwinia amylovora*. Les mécanismes impliqués dans le biocontrôle seront aussi étudiés.
- 4éme Projet, intitulé: IPM 4 Citrus (2017-2020), RISE, H2020. Les deux premières étapes de ce projet porteront sur la preuve de concept et la maturation technologique pour produire et utiliser les endotoxines de *Bacillus thuringiensis*, suivie d'une étape de maturation économique visant à mettre les produits sur le marché. Ces 3 étapes clés seront appuyées par la diffusion et l'exploitation qui garantit le transfert approprié du laboratoire au marché grâce à une solide gestion des droits de propriété intellectuelle. Parallèlement, une 5ème partie, mettra l'accent sur la mise en réseau pour améliorer les compétences des partenaires, tandis que la sensibilisation contribuera à accroître la sensibilisation des parties prenantes.

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 : 05)
- Faiçal BRINI, Maitre de Conférences, Directeur du Laboratoire (CBS)
- Habib KHOUDI, Maitre de Conférences (CBS)
- Walid SAIBI, Maitre de Conférences (CBS)
- Moez HANIN, Professeur (CBS/ISBS)
- Mondher Mejri, Maitre de Conférences (CBS/ISB-Bèja)

Enseignants-chercheurs (corps B : 06)
- Inès YACOUBI, Maitre Assistant (CBS)
- Mouna CHOURA, Maitre Assistant (CBS)
- Rania BEN SAAD, Maitre Assistant (CBS)
- Mohamed Nejib SAIDI, Maitre Assistant (CBS)
- Ikram ZAIDI, Maitre Assistant (CBS)
- Chantal EBEL Maitre Assistant (CBS/ISBS)

Cadres ayant un grade équivalent ou homologue au grade d'assistant de l'enseignement supérieur: (09)
- Siwar Ben AMAR, Post-doc
- Mouna GHORBEL, Post-doc
- Imen AMARA, Post-doc
- Sandra GOUIAA, Post-doc
- Nebrass BELGAROUI, Post-doc
- Marwa DRIRA, Post-doc
- Sana TOUNSI, Post-doc
- Abdelmajid BEN ABDENNOUR, Ingénieur Principal
- Malika AYADI, Ingénieur Principal

Doctorants (Thèses de doctorat es-sciences): (11)

- Héla SAFI	- Karama HAMDI	- Rania JMAL
- Habib MAHJOUBI	- Nabil ZOUARI	- Mariem BRAIDAII
- Sana KOUBAA	- Sahar SELLAMI	- Fatma BOUKID
- Marwa HARBAOUI	- Hassiba BOUAZZI	

Etudiants en Mastère: (05)

- Hanen KAMOUN	- Basma AZZOUZI	- Hajer ZIADI
- Sawssen HARZALLI	- Ons BAHLOUL	

Cadre Technique: (04)
- Chadya Boughanmi, Technicien Supérieur
- 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.

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

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

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

Dans l'objectif d'améliorer la tolérance des plantes aux stress abiotiques, nous avons exprimé un facteur de transcription du type ERF (*TdSHN1*) isolé à partir d'une variété locale de blé dur dans du tabac transgénique. Selon des études précédentes, l'expression de cet ERF est fortement modulée par le stress salin, hydrique, froid et hormonal. Les lignées transgéniques ont été soumises au froid, au stress salin et hydrique. Les études physiologiques ont montré clairement que *TdSHN1* permet une meilleure tolérance au différents stress imposés. Cette tolérance est étroitement liée à une forte capacité anti-oxydante conférée par l'expression du *TdSHN1*. En plus, l'expression de *TdSHN1* a permis une réduction significative de la densité stomatique ce qui a permis aux lignées transgéniques de conserver plus d'eau pendant le stress hydrique. Les analyses physiologiques et moléculaires ont permis de proposer un modèle d'action du *TdSHN1* selon lequel *TdSHN1* reconnait, se lie et active des éléments cis-régulateurs : le boites GCC et DRE se trouvant en amant des gènes de stress osmotique, codants pour des enzymes anti-oxydantes, et impliqués dans la formation de la cuticule. Cette forte induction est probablement le facteur principal qui a permis de conférer la tolérance à divers stress abiotiques montrée par les lignées transgéniques sur-exprimant le facteur *TdSHN1*.

2/ Les Facteurs de transcription de type NAC

Des outils de génomique fonctionnelle et bioinformatiques ont été mis à contribution afin d'analyser l'expression des gènes NAC à partir des données RNA-seq de blé dur et de blé tendre disponibles publiquement. Ceci a permis d'identifier quelques gènes impliqués dans la réponse au stress biotique et/ou abiotique. 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. En outre, trois gènes (NAC38A, NAC38B et NAC47) ont montré des profils d'expression spécifique aux racines sous divers stress. Ces derniers ont été sélectionné pour des études fonctionnelles *in planta*. L'étude d'expression des ces trois gènes après un traitement hormonal avec l'Acide abscissique (ABA) a montré que ces trois gènes sont modulé par ce traitement hormonal au niveau des feuilles ainsi que les racines ce qui suggère qu'ils sont impliqués dans la réponse aux stress via une voie ABA-dépendantes. En outre l'étude de trans-

activation par système simple hybride a révélé que ces gènes sont des activateurs de transcription *in vitro*.

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

Au cours de l'année 2016, nous avons réalisé l'étude fonctionnelle du gène *AlSIP* d'une plante halophyte *Aeluropus littoralis* dans un système hétérologue le tabac. Des plantes transgéniques de tabac sur-exprimant le gène *AlSIP* sous le contrôle du promoteur constitutif 35S-CaMV ont été produites. Les clones transgéniques obtenus et dont la surexpression du transgène a été vérifiée par Northern blot, ont manifesté un niveau de tolérance important contre le stress salin et osmotique *in vitro*. De plus, nous avons testé la tolérance de 3 clones transgéniques contre les stress hydrique et salin en condition de la serre. Nos résultats ont montré que les clones transgéniques sont capables de terminer leur cycle et produire des graines sous les conditions de stress testées alors que les plantes sauvages sont incapables de survivre leur développement. 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 stress salin et osmotique 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 ont montré qu'AlSIP est un gène candidat important permettant d'améliorer la tolérance aux stress hydrique et salin chez le blé ou d'autres plantes d'intérêt agronomique.

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

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

Nous avons démontré au par avant que la MKP de blé, TMKP1 est impliqué dans la réponse au stress salin et hydrique. Une étude plus fine de la structure de TMKP1 a permis d'identifier à travers le logiciel scansite 3 (http://scansite3.mit.edu)/), un motif conservé de liaison aux 14-3-3s 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. 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*. Etant donné que les 14-3-3 sont hautement conservées, nous avons choisi deux isformes d'Arabidopsis (nommées Phi et Omicron) et deux de levure (nommées BMH1 et BMH2), pour les inclure dans des tests d'activité phosphatase sur TMKP. Nos résultats ont montré que l'activité de TMKP1 augmente de manière phospho-dépendante par ces isoformes et cette activation augmente davantage en présence des ions Mn^{2+}. De manière intéressante, le remplacement par mutagénèse dirigée de la sérine phosphorylable dans le site de fixation des 14-3-3 sur TMKP1 (KLPSLP), diminue fortement l'activation de TMKP1 par les différentes isformes testées. Un tel résultat indique le rôle crucial de cette sérine dans la stimulation de TMKP1 et nous incite à investiguer la signification de cette interaction TMKP1/14-3-3 in vivo et en particulier son rôle dans la réponse des plantes aux stress de l'environnement.

2/ Exploration du rôle de l'acide phytique dans la réponse de la plante à une carence en phosphore : Expression hétérologue de la phytase de Bacillus subtilis PHY US417 chez la plante Arabidopsis entraine une meilleure nutrition phosphatée.

Environ 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 (AP) qui n'est pas disponible aux plantes. Ceci amène les agriculteurs d'ajouter aux terres cultivables une grande quantité d'engrais phosphatés pour préserver les rendements des cultures. Cependant 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. Une des solutions biotechnologiques à cette problématique est l'usage d'enzymes spécifiques « les phytases » capables d'hydrolyser l'AP présent en grande quantité aussi bien dans le sol que dans les graines des plantes. En générant des lignées transgéniques exprimant une forme secrétée de PHY-US417, nous avons démontré que celle-ci est capable de mobiliser le Pi à partir du phytate présent dans le milieu extérieur, permettant ainsi une meilleure acquisition de cet élément et croissance végétale. Remarquablement, l'amélioration de la croissance en conditions de carence en Pi ne s'est pas limitée aux plantes qui secrètent cette phytase mais s'est étendue à d'autres plantes sauvages (*Arabidopsis* ou Tabac) co-cultivées avec celles-ci. Une telle avancée offre une nouvelle perspective dans l'amélioration de la croissance et des rendements des plantes dans des sols pauvres en Pi en pratiquant des co-cultures associant des espèces capables de secréter la phytase pour mobiliser cet élément.

3/ Essais d'amélioration de la productivité végétale en conditions de stress chez le blé via un régulateur du cycle cellulaire : Rôle du gène TdRL1 de blé dans le contrôle cellulaire et la réponse des plantes aux stress abiotiques

Nous avons isolé à partir du blé dur TdRL1 (*Triticum durum RSS1-like 1*) l'homologue du gène RSS1 de riz requis pour la tolérance au stress salin. 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. Ainsi, cette action vise à comprendre le contrôle du cycle cellulaire et du développement surtout en conditions de stress et ce à travers essentiellement l'étude du rôle de la protéine RSS1-like isolée à partir du blé dur. Dans le but de comprendre le rôle de TdRL1 '*in planta*' nous l'avons sur-exprimé chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* en fusion C-terminale avec différentes étiquettes (HA, GFP et RFP). Ces lignées indépendantes ont été caractérisées phénotypiquement plus en détails en mesurant en premier lieu leur taux de germination au 2ème et au 5ème jour (émergence de la racine et verdissement des cotylédons) en conditions normales et en conditions de stress salin. Les différentes lignées sur-exprimant TdRL1 montrent un taux de germination meilleur par rapport à celui du sauvage en conditions de stress avec des améliorations variables. Le taux d'expression de TdRL1 est corrélé avec l'amélioration du pouvoir germinatif en conditions de stress. Nous avons par ailleurs, mesuré la biomasse de plantules sauvages et sur-expresseurs après germination en conditions normales et en conditions de stress. Les mesures de poids frais à 7 jours de la lignées TdRL1:: RFP3b sont supérieures de 19 % par rapport au sauvage en conditions normales mais aussi de 14 % après germination en conditions de stress. Il semblerait donc que TdRL1 contribue à un meilleur développement et assure une meilleure accumulation de la biomasse en conditions normales et en conditions de stress.

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

Les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) sont très abondantes dans les protéomes eucaryotes et impliquées dans des processus biologiques et cellulaires clés. Bien que certaines ressources de prédictions de protéines désordonnées soient disponibles à partir de protéomes animaux et végétaux, celles relatives aux céréales sont largement inconnues. Vu l'importance de ces protéines, on s'est intéressé à identifier, caractériser et répertorier les IDPomes de *Oryza sativa*, *zea mays*, *sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* and *Brachypodium distachyon*. Les pourcentages de désordre sont similaires entre les espèces étudiés. D'autre part, les analyses de Gene Ontology (GO) montrent que les IDPs sont surtout impliqués dans les processus de régulation cellulaires et métaboliques, et particulièrement dans la réponse aux stimuli environnementaux. Par ailleurs, on trouve que les IDPs sont enrichies dans les voies de synthèses de métabolites et des composés aromatiques. Une étude comparative avec la plante modèle *Arabidopsis thaliana* révèle des résultats similaires avec les céréales étudiés. C'est un résultat qui suggère que les plantes utilisent un mécanisme cellulaire commun pour l'adaptation aux contraintes environnementales.

Projet 3: 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 utilisées par les agriculteurs sont des variétés améliorées ayant fait recours à « des génotypes fondateurs » déjà fourmis par les programmes internationaux d'amélioration comme ICARDA et CIMMYT. Ce projet et à travers ses différentes actions vise :

1. La formation une collection du blé dur représentative du « germoplasme » Tunisien,
2. Caractérisation de cette dernière de point de vue morpho-agronomique-physiologique et moléculaire
3. Evaluation de potentialités physicochimiques et technologiques de certaines variétés/ accessions.

Au cours de l'année 2016-2017 seulement certaines actions ont progressé. Le développement de ce travail a nécessité la collaboration avec ESAK (Ecole Supérieure d'Agriculture de Kef) pour les différents essaies en plein champs.

1/ Formation d'une collection de blé dur Tunisien (CBS Durum Wheat Collection) et son évaluation morpho-agronomique en plein champs dans les conditions semi-aride

Au cours de cette dernière année, la collection du blé dur a été enrichie par des accessions algériennes connues pour leur tolérance à certaines contraintes abiotiques (sécheresse-salinité) et aussi par des nouvelles accessions Tunisiennes récupérées de Banque Gènes du Corée du Sud (dans le cadre d'un projet Bilatéral). La multiplication a été faite conjointement au niveau de la station expérimentale d'ESAK (Ecole Supérieur d'Agriculture du Kef par le DR. Rhouma Sayar) et aussi au niveau de la serre du CBS.

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

Durant cette année, notre travail a été focalisé sur la mise en place de l'utilisation des marqueurs moléculaires, commande, achat matériel-optimisation des protocoles. Une première liste de marqueurs moléculaires du type EST-SSRs et SSRs, couvrant le génome de blé dur, a été établie

en se basant sur des bases de données publiques et certaines publications. L'analyse de certains produits de réaction PCR (correspondant à des marqueurs du type EST-SSRs) par électrophorèse (sur gel d'agarose) n'a pas permis de détecter un polymorphisme entre les accessions étudiées. Durant cette année, on va essayer de mettre et d'optimiser d'autres techniques de genotypage moléculaire.

3/ 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 du vingtième siècle. Cette collection renferme sept landraces (Hamira, Jnah Khotifa, Richi, Beskri, Agili, Mahmoudi and Bidi), cinq anciennes variétés (Chili, Kyperounda, Badri and Maghrebi) and 6 variétés modernes à haut rendement (Karim, Khiar, Om Rabia, Nasr, INRAT 69, Maali et Salim) issues de programme d'amélioration national et international. Au cours de ce travail différents paramètres ont été étudiés : i) Les composantes de rendement : le rendement, le nombre de grains par épie et le poids de mille graines. ii) Les paramètres physicochimiques : la Teneur en protéine, en amidon total, en amylopectine, amylose et en cendre. iii) 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. Les programmes d'amélioration récents ont amélioré le rendement en grains (Yield) et le nombre de grains par épis (Grain per Spike), alors qu'ils ont réduit le poids de mille grains (Thousand Kernel weight) qui est un critère de qualité assez important. Khiar et Maali, deux variétés améliorées (à haut rendement), sont caractérisés par des teneurs importantes en amidon total, en amylose, en pigments jaunes, protéines solubles ; En plus, ces deux variétés ont montré un indice de sédimentation et une résistance du gluten permettant leur utilisation pour la fabrication des pâtes. Cependant, les landraces, avec une forte teneur en amylopectine, teneur en protéines, vitreux et un poids de mille grains important, étaient plus adaptées pour la fabrication du Couscous et du Bulghur. L'analyse statistique des résultats obtenus a révélé une grande diversité et variabilité au niveau landraces et les cultivars anciens, contrairement aux génotypes améliorés. Encore une fois, ce travail a montré que les programmes de sélection variétale (Nationale ou internationale) ont réduit la diversité. Nos résultats ont montré que les landraces tunisiennes de blé dur pourraient servir comme nouvelles génotypes fondateurs et réservoir pour améliorer les traits de qualité.

Projet 4: Exploration et valorisation des macromolécules associées au stress chez les plantes

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

La graine constitue un modèle expérimental de choix chez les végétaux pour étudier les mécanismes de tolérance à la sécheresse. Parmi les polypeptides accumulés dans les embryons matures des graines, les protéines LEA constituent la famille la plus grande. La synthèse des protéines LEA, strictement limitée aux embryons, n'est pas détectée dans les tissus végétatifs qu'en conditions de stress abiotiques. Les protéines LEA n'ont pas de structure et elles sont actives à l'état désordonné. La majorité des protéines LEA sont très hydrophiles et renferment plusieurs séquences répétées riches en lysine et glycine. En se basant sur la régulation ainsi que sur la composition en acides aminés, il a été suggéré que ces protéines pourraient jouer le rôle d'osmoprotecteur ou de protéine réparatrice des dommages dus à la dessiccation. Nous avons

isolé deux protéines LEA groupe 3 de taille différente : clone 4Td de 723 pb et clone 8Td de 639 pb. Ces deux protéines ont montré un motif spécifique aux LEA-4. L'alignement multiple de séquences et l'étude phylogénétique montrent des régions conservées et une similarité importante avec ceux de l'orge, du blé tendre et du riz. L'étude du niveau d'expression des deux protéines LEA-4 identifiées chez deux variétés locales de blé dur à comportement contrasté vis à vis de la salinité a montré une accumulation différentielle selon le tissu et la variété. Nous avons réussi de produire et de purifier la protéine 8Td. Selon les analyses de Western Blot, la protéine purifiée a une taille de 21 kDa. Les résultats du CD et du FTIR affirment que la protéine 8Td est largement désordonnée dans l'eau pure et elle tend à former la structure α-hélice pendant la dessiccation. Les spectres obtenus suite à l'addition des concentrations croissantes de glycérol (Gly) à 8Td conduit à un gain progressif en hélice α. La structure hélice est généralement stabilisée au sein de la membrane. De plus, les analyses fonctionnelles initiales démontrent que 8Td n'interagit pas avec les membranes phospholipidiques à l'état sec. Des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant les deux cDNAs 4Td et 8Td est en cours pour évaluer leurs réponse quand aux stress abiotiques.

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

Les protéines de transfert de lipides (LTPs) sont membres de la famille des protéines (PR-14) liées à la pathogenèse qui sont impliquées dans les réponses de défense des plantes. Plusieurs membres de la famille des LTPs ont été identifiés comme des allergènes pertinents dans les pollens et les aliments des plantes. La résistance élevée des LTPs alimentaires au traitement thermique et à la digestion protéolytique par des enzymes gastro-intestinales est liée à leur capacité à induire des symptômes allergiques chez de nombreux patients. Un des objectifs de cette action est d'investiguer les propriétés antimicrobiennes et allergéniques d'une protéine de transfert de lipides isolée du blé dur nommée TdLTP4. Pour ce faire, la protéine TdLTP4 a été exprimée sous forme recombinante chez deux systèmes d'expression différents *Pichia pastoris* et *E. coli*. Des étapes de purification ont été faites afin d'obtenir une protéine bien pure et biologiquement active. Nos premiers résultats ont montré une importante capacité de liaison aux IgE de la protéine TdLTP4 avec des sérums de patients allergiques et sensibilisés aux LTPs alimentaires. Ces données fournissent la preuve d'une forte réactivité croisée des IgE de TdLTP4 de blé avec plusieurs LTPs d'origine végétale. Egalement, des essais d'activités anti-microbiennes in vitro ont montré que la protéine TdLTP4 possède une activité antifongique puissante contre *Botrytis cinerea*, mais moyenne *contre Fusarium graminearum* et *Fusarium oxysporum*. Concernant l'activité antibactérienne, une légère inhibition a été observée chez quelques souches bactériennes telles que *Micrococcus luteus* et *Agrobactérium tumefasciens*. En parallèle et afin de pouvoir bien analyser la localisation tissulaire et l'expression du gène isolé TdLTP4, des plantes transgéniques *d'Arabidopsis thaliana* exprimant une fusion transcriptionnelle d'une région promotrice (900 pb) du TdLTP4 avec le gène rapporteur GUS ont été générées. Une analyse histochimique de l'activité GUS chez des plantules âgées de 8 jours a indiqué une faible activité GUS au niveau des feuilles en condition contrôle et une activité assez intense dans les feuilles des plantules soumises à un stress par Mannitol mais moins intense par les stress NaCl et ABA. Cela suggère que le gène TdLTP4 est exprimé très précocement au cours du cycle de développement de la plante et il est induit par le stress.

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 transgénèse végétale. Nous comptons dans le présent programme de recherche du laboratoire 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 de ce contrat programme.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications Internationales en 2016

1. Said MN, Mergby Dh, Brini F (2017) Identification and expression analysis of the NAC transcription factor family in durum wheat (Triticum turgidum L. ssp. durum). Plant Physiology and Biochemistry, 112: 117-128.

2- Choura M, Rebaï A (2017) Exploring disorder in the human charged biased proteins. *J Recep sign Trans* http://dx.doi.org/10.1080/10799893.2017.1286678

3- Ghorbel M, Cotelle V, Ebel C, Zaidi I, Ormancey M, Galaud J-P, and Hanin M. (2017) Regulation of the wheat MAP kinase phosphatase 1 by 14-3-3 proteins. Plant Science. *In press.*

4. Dabbous A, Ben Saad R, Brini F, Farhat-Khemekhem A, Zorrig W, Abdely Ch, Ben Hamed K(2017). Over-expression of a subunit E1 of a vacuolar H^+-ATPase gene (*Lm VHA-E1*) cloned from the halophyte *Lobularia maritima* improves the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to salt and osmotic stresses. *Environmental and Experimental Botany.* http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.envexpbot.2017.01.013.

5- Secco D, Bouain N, Rouached A, Prom-U-Thai C, Hanin M, Pandey AK, and Rouached H. (2017) Phosphate, phytate and phytases in plants: from fundamental knowledge gained in Arabidopsis to potential biotechnological applications in wheat. Crit Rev Biotechnol. 12:1-13. doi: 10.1080/07388551.2016.1268089.

6. Feki K, Tounsi S, Masmoudi K, Brini F (**2016**) The durum wheat plasma membrane Na^+/H^+ antiporter SOS1 is involved in oxidative stress response. Protoplasma, DOI 10.1007/s00709-016-1066-8

7. Drira M, Hanin M, Masmoudi K, Brini F (**2016**) Comparison of full-length and conserved segments of wheat dehydrin DHN-5 overexpressed in Arabidopsis thaliana showed different responses to abiotic and biotic stress. Functional Plant Biology, 43 (11), 1048-1060.

8. Brini F (**2016)** Genetic Transformation of Wheat: Current Status and Futures Challenges. Book entitled ''Agricultural Research Updates''. ISBN: 978-1-63485-648-5, edited by Prathamesh Gorawala and Srushti Mandhatri. NOVA Science Publishers, vol 13, Chapter 6, pp 105-131.

9. Benderradji L, Kellou K, Ghadbane M, Salmi M, Saibi W, Benmahammed A, Bouzerzour H, Brini F **(2016**) Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on *in vitro* bread wheat (*Triticum aestivum* L.) growth parameters and biological control mechanisms. Advances in Microbiology, 6: 677-690.

10.Tounsi S, Ben Amar S, Masmoudi K, Sentenac H, Brini F, Véry AA (**2016**) Characterisation of two HKT1;4 Transporters from *Triticum monococcum* to elucidate the Determinants of the Wheat Salt Tolerance *Nax1* QTL. Plant Cell Physiology.57 (10), 2047-2057, doi: 10.1093/pcp/pcw123

11. Boubakri H, Gargouri M, Mliki A, Brini F, Chong J, Jbara M (**2016**) Vitamins for enhancing plant resistance. Planta, DOI 10.1007/s00425-016-2552-0

12. Benderradji L, Hadji N, Kellou K, Benniou R, Brini F (**2016**) Effet du NaCl et du PEG sur le comportement morpho-physiologique et biochimique des variétés de blé dur et tendre cultivées in vitro en milieu hydroponique. Revue Agriculture, Université Abbas Sétif 1. 1 :278-286.

13. Feki K, Brini F (**2016**) Role of proteins in alleviating drought stress in plants. Book entitled ‘’ Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach’’ edited by Parvaiz Ahmed. Chapter 12, pp 165-176.
14. Saibi W, Zouari N, Masmoudi K, Brini F (**2016**) Role of the durum wheat dehydrin in the function of proteases conferring salinity tolerance in Arabidopsis thaliana transgenic lines. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85 : 311-316.
15. Feki K, Farhat-Khemakhem A, Kammoun Y, Saibi W, Gargouri A, Brini F (**2016**) Responses of transgenic Arabidopsis plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*. 198 : 56-68.
16- Choura M, Hanin M, Rebaï A, Masmoudi K (**2016)** From FHB Resistance QTLs to Candidate Genes Identification in Triticum aestivum L. *Interdiscip Sci.* Computational Life Sci. 8(4):352-356.
17- Hanin M, Ebel C, Ngom M, Laplaze L, and Masmoudi K. (**2016**) New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. Frontiers Plant Sci. doi.org/10.3389/fpls.2016.01787
18- Belgaroui N, Berthomieu P, Rouached H, and Hanin M. (**2016**) The secretion of the bacterial phytase PHY-US417 by Arabidopsis roots reveals its potential for increasing phosphate acquisition and biomass production during co-growth. Plant Biotechnol J. 14: 1914-1924.
19- Zaidi I, Ebel C, Belgaroui N, Ghorbel M, Amara I, and Hanin M. (**2016**) The wheat MAP kinase phosphatase 1 alleviates salt stress and increases antioxidant activities in Arabidopsis. J Plant Physiol. 193: 12-21.
20. Boudabbous M, Saibi W, Bouallagui Z, Dardouri M, Sayadi S, Belghith H, Mechichi T, Gargouri A. **(2016**) A fast activated-charcoal pre-purification of *Fusarium solani* ß–glucosidase for an efficient Oleuropein bioconversion. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* DOI: 10.1080/10826068.2016.1201679
21. Boudabbous M, Ben Hmad I, Saibi W, Mssawra M, Belghith H, Gargouri A (**2016**) Trans-glycosylation capacity of a highly glycosylated multispecific ß-glucosidase from *Fusarium solani. Bioprocess Biosyst. Eng*. DOI 10.1007/s00449-016-1721-7
22- Djemal, R., Khoudi, H. (**2016**) TdSHN1, a WIN1/SHN1-type transcription factor, imparts multiple abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. Environmental and Experimental Botany 131: 89-100.

FORMATION DIPLOMANTE

Habilitation Soutenues en 2016 (Nombre total : 01) :

- **Walid Saibi :** soutenue le 08/09/2016 à l’ENIS

Thèses Soutenues en 2016 (Nombre total : 03) :

- **Marwa Drira :** soutenue le 07/09/2016 à la FSS.
- **Nebrass Belgaroui :** soutenue le 17/12/2016 à la FSS.
- **Sana Tounsi :** soutenue le 06/02/2017 à la FSS.

Mastères Soutenus en 2016 (Nombre total : 02) :

- **Marwa Harbaoui :** soutenu le 01/12/2016 à la FSG.
- **Hassiba Bouazzi :** soutenu le 26/07/2016 à la FSS

PROJETS DE RECHERCHE 2016

- **Bilatéral: TUNGER**, Paul-Ehrlich Institut, Federal Institut for Vaccines and Biomedicines, Langen, Allemagne.
- **Bilatéral: Tuniso-Korean:** Korea University, Crop Molecular Breeding Laboratory Division of Biotechnology, South Korea.
- **Convention:** Cooperation agreement between the Institut of Food Technology, Serbia and the Centre of Biotechnology of Sfax-Tunisia.

LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB)

مخبر الأحياء الدقيقة والجزيئات الفعالة

Responsable : Pr. Lotfi MELLOULI

Email : lotfi.mallouli@cbs.rnrt.tn

LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

Chercheurs

Corps A:

Pr. Lotfi MELLOULI (CBS)
Pr. Hichem CHOUAYEKH (CBS)
Pr. Radhouane KAMMOUN (ISBS)
Dr. Riadh BEN SALAH (M.C. CBS)

Corps B

Dr.Sondes KARRAY-CHOUAYEKH (M.A. ISEP)
Dr. Slim SMAOUI (Ass. CBS)

Docteurs

Dr. Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA
Dr. Mouna KRIAA
Dr. Imen TRABELSI-KANOUN
Dr. Ines BOUKHRIS- CHOUAYEKH
Dr. Ameny FARHAT-KHEMAKHEM

Cadres techniques

Ines KARRAY-REBAI (Ing. En Chef)
Monia BLIBECH-HAMMAMI (Ing. Princ.)
Maher HMIDI (Tech. Princ)
Kameleddine BOUCHAALA (Ass.App.Rech.Princ.)

Doctorants

- Soumaya NAJAH
- Imen SELLEM
- Fatma KAANICHE
- Sirine BEN SLIMA
- Nadia BAYAR
- Yosri BEN NASR
- Marwa BEN RHOUMA

PFE en cours (pour obtention du diplôme d'ingénieur): 04

OBJECTIFS GENERAUX

Globalement, les objectifs du contrat programme 2015-2018 du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB) consistent : 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 à valoriser des co-produits issus de l'agriculture et de l'agro-industrie. D'autre part, la formation d'étudiants (PFE, Masters et Thèses) et la compréhension détaillée de l'expression génique de quelques métabolites I^{aires} et II^{aires}.

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 agro-alimentaire (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 d'additifs naturels, en milieu semi solide, pour utilisation en alimentation animale et comme bio-fertilisants.

5. Détection, analyse et compréhension des phénomènes de l'expression génique de quelques voies de biosynthèses de métabolites primaires (ex. les phytases) et secondaires (les voies de biosynthèses des rhamnopyranosides).

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.

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Projet 1: Biomolécules pour des applications industrielles et agricoles (Responsable Pr. Lotfi MELLOULI).**».**

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 principaux: Le premier objectif, qui constitue l'axe principal de recherche, consiste à développer des biomolécules pures et des extraits bioactifs naturels à partir de microorganismes et de plantes pour des utilisations en agriculture (lutte biologique) et dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique. 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 les clusters de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de deux biomolécules de la famille des rhamnopyranosides de la souche de *Streptomyces* TN58.

I. Biomolécules de *Streptomyces*

Extrait bioactif de la souche de *Streptomyces* TN258 contre les deux phytopathogènes *Pythium ultimum* (agent causal de la pourriture de la pomme de terre) et *Verticillium dahliae* (agent de la verticilliose chez l'olivier):

- Cet extrait bioactif détruit et fait éclater les oospores (la forme de résistance) du *P. ultimum* **(Fig. 1).**

- L'extrait bioactif de la souche TN258 inhibe le développement du *V. dahliae*, supprime la verticilliose au niveau des arbres d'oliviers naturellement infectés et diminue considérablement le nombre des microsclérotes qui représentent la forme de résistance de ce phytopathogène. Sous serre, l'extrait bioactif de la souche TN258 empêche la progression de la verticilliose au niveau des jeunes arbres d'oliviers artificiellement infectées et améliore leurs paramètres biochimiques (taux en polyphénols, en proline et en pigments).

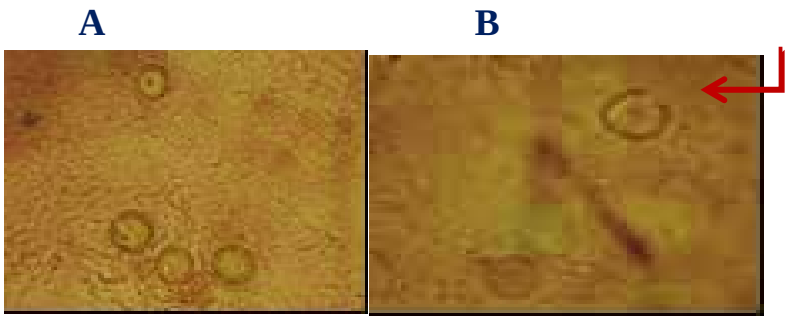


Figure 1. Observations microscopiques de la morphologie des oospores du *P. ultimum* en absence (**A**) et en présence (**B**) du surnageant bioactif de la souche TN258

- Extraction et purification de biomolécules pures à partir d'une fermentation de 20 litres de la souche TN258. Caractérisation de la structure chimique de ces biomolécules. Quatre de ces biomolécules pures (M4, M9, M10 et M11) ont été testées pour leurs activités anticancéreuses contre trois lignées cellulaires: la lignée du cancer de l'utérus HeLa, la lignée du cancer colorectal Caco-2 et la lignée du cancer du sein MCF7. Nous avons constaté que la molécule M9 à 100 µM, diminue considérablement la survie des cellules HeLa à 11,9 % et inhibe complètement à 0 % la survie de la lignée MCF-7.

II. Biomolécules (bactériocines) de bactéries lactiques

- Nous nous sommes intéressés à l'étude des interactions entre les paramètres qui reflètent les oxydations lipidiques (indice de peroxyde «PV», les diènes conjuguées «CD» et TBARS) et les oxydations protéiques (% MetMb et les groupements Sulphydryles «Sulph» et carbonyles «Carb») durant la conservation des la viande hachée en absence et en présence de la bactériocine BacTN635 à 1000U/g. Pour cette réalisation, nous avons défini les réseaux Baysian par le biais du program R. Nous avons constaté que l'utilisation de la BacTN635 réduit de façon très importante les intéractions des paramètres d'oxydations lipidiques et protéiques (**Fig. 2**) ce qui se traduit par une amélioration nette de la qualité de la viande hachée lors de la conservation à 4°C.

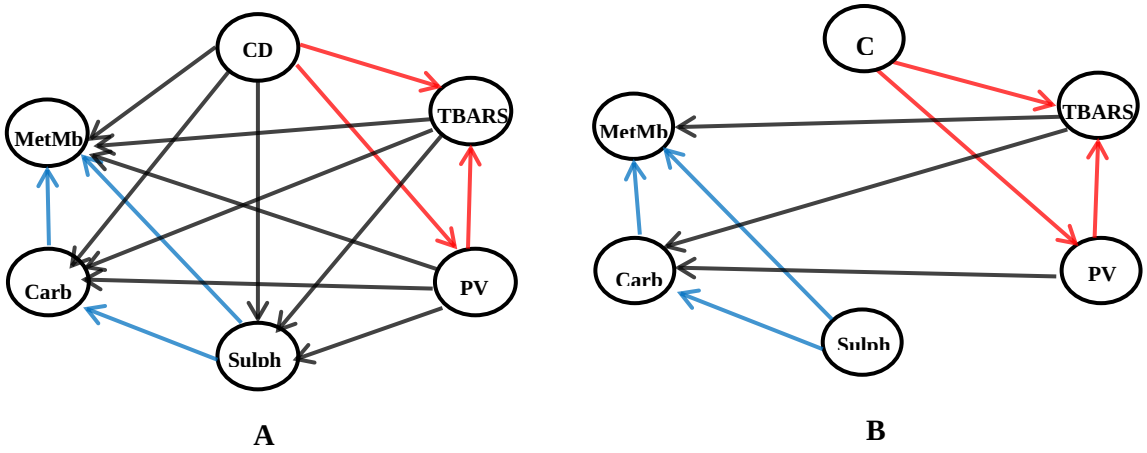


Figure 2. Interactions des paramètres d'oxydations lipidiques et protéiques durant la conservation de la viande hachée en absence (**A**) et en présence (**B**) de BacTN635.

- Dans des travaux antérieurs, nous avons purifié et caractérisé une bactériocine appelée BacFL31 qui présente dans sa partie NH2-terminale six résidus d'hydroxyprolines (la seule bactériocine décrite jusqu'à maintenant ayant cette caractéristique). BacFL31 possède une action

bactéricide contre le pathogène *L*istéria *monocytogenes*. Nous avons étudié le mécanisme d'action de BacFL31 contre ce pathogène. BacFL31 dégrade la membrane cellulaire et conduit à la destruction de *L. monocytogenes* (**Fig. 3**).

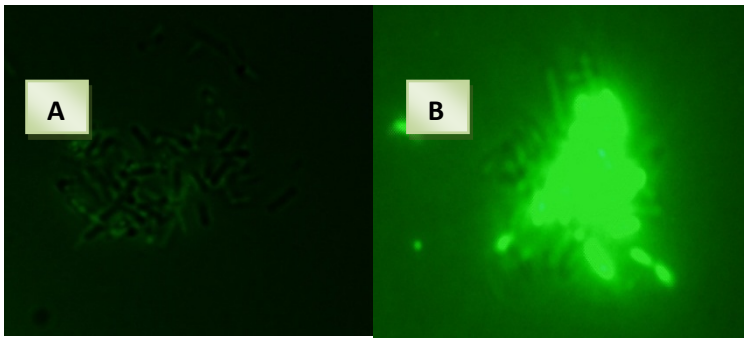


Figure 3. Les cellules de *L. monocytogenes* analysées par microscopie de fluorescence en absence (**A**) et en présence (**B**) de BacFL31 à 1XMIC.

III. Voies de biosynthèses des deux biomolécules rhamnopyranosides de la souche de *Streptomyces* TN58.

- Analyse complète du génome de TN58:

  * Taille du génome : 7.400.929 bp avec une topologie linéaire
  * Richesse en G+C de 72.3% ; 7 opérons ARNr et 69 gènes ARNt
  * Séquences terminales inversées répétées 185.105 bp
  * 6807 séquences codantes et présence de 30 clusters putatifs de biosynthèse de métabolites secondaires.

- Les clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse des deux molécules de rhamnopyranosides sont en cours d'identification par les techniques de disruptions de gènes, de complémentations génétiques et chimiques, d'expressions homologues et hétérologues et d'analyses chromatographiques et spectroscopiques.

Projet 2 :Enzymes et bactéries vecteurs d'activités enzymatiques en nutrition/santé animale (Responsable Pr. Hichem CHOUAYEKH)

***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)

I. Les enzymes phytases

La faible digestibilité du P-phytique chez les animaux monogastriques nécessite la supplémentation de leurs aliments avec du Pi. Ceci engendre un coût supplémentaire et augmente la pollution de l'environnement par l'excrétion d'excréments très chargées en P. Les phytases catalysent la déphosphorylation séquentielle de l'acide phytique (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 phosphate) et ses sels (phytates) pour générer du phosphate inorganique (Pi), des dérivés du *myo*-inositol phosphate (IP1 ; IP2 ; IP3 ; IP4 ; IP5) et les minéraux liés à la molécule du *myo*-inositol phosphate.

I. 1. Clonage et caractérisation de la β-propeller phytase produite par la souche *Streptomyces* sp. US42

Dans le cadre du projet CMCU n° 11G 0924 (CHOUAYEKH/VIROLLE) nous nous sommes focalisés sur l'étude de la phytase extracellulaire produite par la souche *Streptomyces* sp. US42. Nous avons amplifié par PCR le gène codant la phytase de la souche US42 et l'analyse de la séquence de ce gène montre qu'il code pour un polypeptide de 435 acides aminés (PHY US42) présentant un et six résidus différents avec les phytases de *S. lividans* TK24 et *S. coelicolor* A3 (2), respectivement. La phytase PHY US42 a été purifiée et caractérisée. Elle possède une masse moléculaire de l'ordre de 48 kDa et une activité optimale à pH 7 et à 65 °C et dépendante du calcium (comme les β-propeller phytases issues du genre *Bacillus*). PHY US42 est parfaitement stable à des pHs allant de 5 à 10 et sa stabilité thermique est fortement augmentée en présence de calcium. En effet, PHY US42 maintient 80 % d'activité après 10 min d'incubation à 75 °C en présence de 5 mM de $CaCl_2$. PHY US42 présente également une grande stabilité après incubation à 37 °C pendant 1 h en présence de bile bovine et de protéases digestives telles que la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. En effet, PHY US42 garde 90 % de son activité après incubation pendant 1 h en présence de 0.5 % de bile bovine et maintient également 87, 70 et 61 % de son activité après 1 h d'incubation en présence de pepsine, trypsine et chymotrypsine, respectivement. La modélisation moléculaire de PHY US42 indique qu'elle appartient au groupe des β-Propeller Phytases (βPP) qui sont généralement calcium-dépendantes (**Fig. 4**).

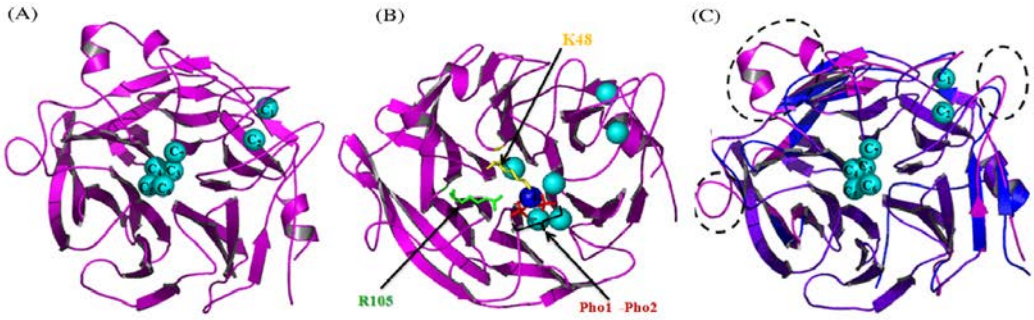


Figure 4. (A) 3D-Structure of PHY US42 (magenta), **(B)** Structure of PHY US42 revealed the binding of sevencalcium ions (C1-C7). Six calcium are presented by turquoise balls. C4 is represented by a dark blue ball. This calcium ion close to the substrate binding site is thought to interact with R105 (green) and K48 (yellow) and the phosphate binding sites PhoP1-PhoP2 (red), **(C)** Superimposition of structural models of phytases TS-Phy from *B. amyloliquefaciens* (blue) and PHY Us42 (magenta). The calcium ions are represented as turquoise balls, the extra helices and loops in PHY US42 structure are surrounded by black dotted circles.

I. 2. Etude de la régulation de l'expression de gènes phytase de *Streptomyces*

Dans le cadre du projet CMCU n° 11G 0924 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 ß-glucuronidase. Ainsi, nous avons démontré que la délétion de la boîte PHO localisée en amont du -35 entraîne une réduction du niveau d'induction PhoP-dépendante 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.

I. 3. Développement de nouvelles applications des enzymes phytases

Nous avons initié en 2016 un nouvel axe qui vise à développer de nouvelles applications biotechnologiques des phytases appartiennent aux groupes HAP et βPP (**Fig. 5**).

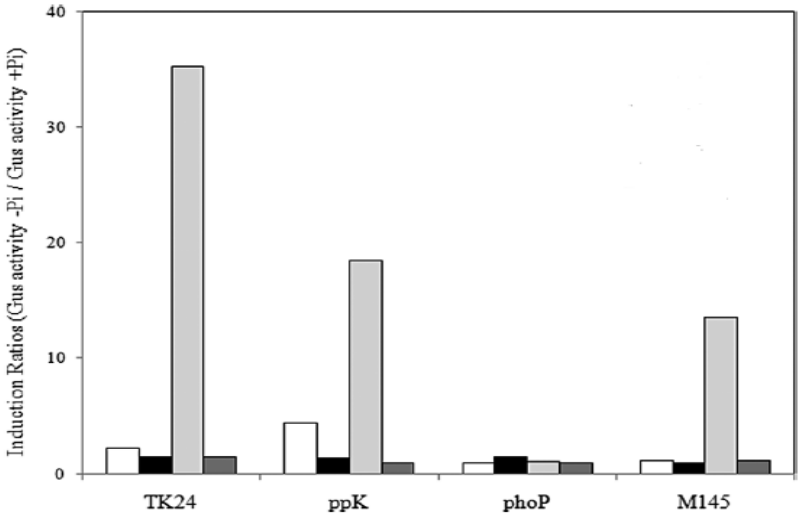


Figure 5. Induction ratios (Gus activity in –Pi/Gus activity in +Pi) of the transcriptional fusions of *phyWT* (white histograms), *phym*1 (black histograms), *phym*2 (light grey histograms), and *phym*1+2 (dark gray histograms) promoter regions with the *gus*A reporter gene integrated into *S. lividans* TK24, the *phoP* and *ppk* mutant strains derived from it and *S. coelicolor* grown for 48h in liquid HT medium supplemented with 20 mM phosphate (+Pi) or with no phosphate supplementation (-Pi)

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 des facteurs anti-nutritionnels : 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 ceci la β-mannanase est ajoutée pour digérer les mannanes, améliorer le taux de conversion de l'aliment et les performances de croissance. Suite à un criblage, nous avons sélectionné 5 souches nommées US134, US150, US176, US180 et US191 produisant une activité mannanase extracellulaire. Nous avons entamé l'optimisation des conditions de production de la β-mannanase extracellulaire produite par la souche *Bacillus subtilis* US191 possédant le niveau de sécrétion de l'activité enzymatique le plus élevé, moyennant la méthodologie des plans d'expériences. Le gène codant la β-mannanase Man US191 produite a été cloné et séquencé. Il code pour un polypeptide de 320 aas présentant 99% d'identité (317/320) avec les β-mannanases de *Bacillus subtilis* E1 et *Bacillus pumilus* CCAM080065. Le gène *man US191* a été par la suite cloné dans des vecteurs d'expression/sécrétion chez *E. coli* (pET 28b) et *B. subtilis* (pBS Mul2) en vue de surproduire cette mannanase. L'optimisation des conditions de production en vue de la caractérisation biochimique de ces enzymes recombinantes est en cours. Par ailleurs, nous avons évalué le

potentiel des 5 souches US134, US150, US176, US180 et US191 pour une 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.

Projet 3 : Production et Formulation de biofilms bactériens en agroalimentaire **(**Responsable Dr. Riadh BEN SALAH).

***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)

Différentes stratégies peuvent être employées afin de réduire la présence d'additifs alimentaire cancérigène et des graisses dans la viande et les produits carnés, ceci afin de développer des produits carnés fonctionnels. Parmi les stratégies technologiques employées, ceux qui sont basées sur la transformation des systèmes carnés sont considérés comme étant les plus prometteurs. L'amélioration de la composition des produits carnés peut être achevée grâce à différentes options en modifiant les ingrédients utilisés au cours de leurs préparations. Une de ces stratégies étant l'incorporation de microorganismes probiotiques à effets bénéfiques pour la santé humaine combinée à des fibres alimentaires.

La substitution du nitrite par la souche probiotique et de la graisse par la fibre de Bambou a été réalisée en adoptant la méthodologie des plans d'expériences. Les effets de cette substitution sur la qualité microbiologique, sensorielle, texturale et la couleur de la Merguez de bœuf montre que :

- Pour l'analyse microbiologique, on constate que le nombre des germes mésophiles et psychrophiles, est presque proche pour tous les échantillons. Pour les entérobactéries, on constate que le nombre de ces germes est variable d'une expérience à une autre. Pour la recherche de *Salmonella*, on constate que ce germe est absent pour toutes les saucisses.
- Pour l'analyse sensorielle, toutes les valeurs qui ont été attribuées par les observateurs sont supérieures à 7/10. Les notes attribuées aux paramètres de la texture, couleur et acceptabilité total (**Fig. 6A**) étaient supérieurs à celle attribués pour l'odeur (**Fig. 6B**).

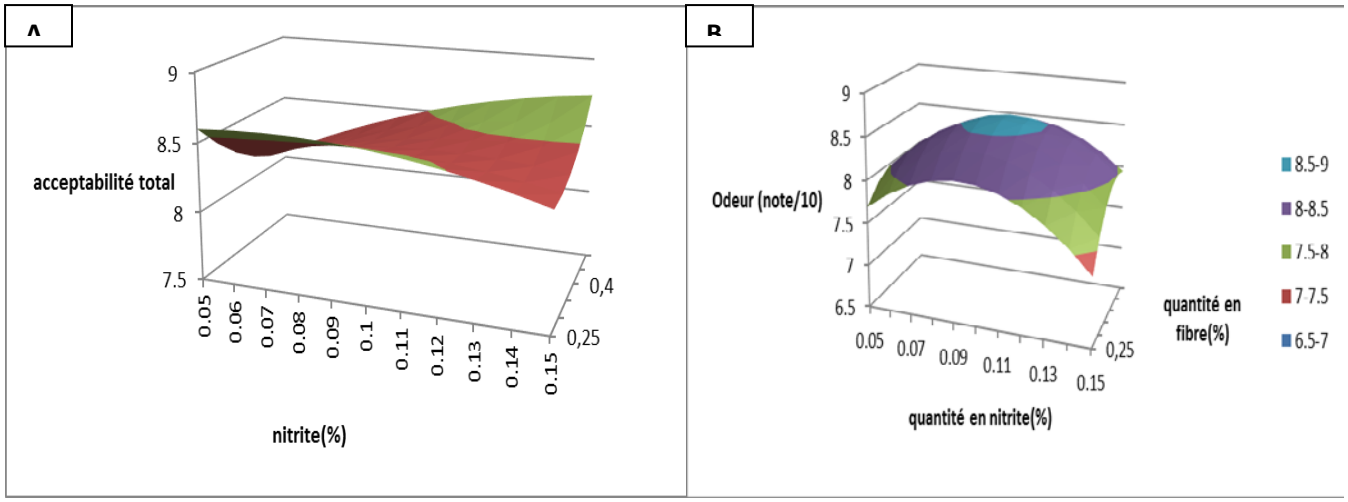


Figure 6. Notes attribuées aux paramètres de l'acceptabilité totale (**A**) et de l'odeur (**B**).

- Pour la texture, 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 cohésion. Par contre une augmentation a été observée pour la rigidité.
- Pour l'analyse de la couleur, il existe une augmentation de l'indice de rouge a* et pas de changement pour l'indice de jaune 'b* et l'indice de luminosité 'L*''.

L'analyse physico-chimique n'a montré aucune différence significative pour les paramètres (teneur en protéines, matières sèches et cendres) de la saucisse fraiche de bœuf, alors 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.

Projet 4 : Valorisation des Agroressources par la voie microbienne (Responsable Pr. Radhouane KAMMOUN).
***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.

I. Extraction, Caractérisation et Fonctionnalité de Polysaccharides de raquette d'*Opuntia Ficus Indica*

Nous avons réalisé des expériences d'extractions de pectines par ultrasons et par enzymes dans les conditions optimales obtenues par un plan d'expériences. Les résultats obtenus montrent des différences entre les deux pectines essentiellement au niveau du taux d'extraction, teneur en cendres, degré d'estérification, propriétés moussantes et émulsifiantes. Concernant la stabilité de ces mousses, nous avons remarqué que seules les pectines extraites par ultrasons assurent une stabilité comparable à celle du témoin durant une semaine de stockage à 4°C. Pour les boissons lactées acides, les pectines extraites par les enzymes assurent une meilleure stabilité des émulsions par rapport aux pectines extraites par ultrasons.

II. Etude de la valorisation des agro ressources par fermentation en milieu semi solide afin de produire des bio-fertilisants.

Nous avons étudié la cinétique de croissance, de production de la glucose oxydase (GOD) d'*A. tubingensis* CTM 507 et la libération de glucose en milieu semi solide en mode batch et batch alimenté. Le traitement des plantes de blé à différentes concentrations de la GOD semi purifiée (20U/ml, 40U/ml, 60U/ml, 80U/ml, 100U/ml et 120U/ml) a montré une amélioration du taux et des paramètres de croissance. Le traitement par 80 U de GOD, a montré une croissance optimale, une augmentation du poids frais de la biomasse (g/plante), du poids sec de la biomasse aérienne et le poids sec des racines soit 14, 8 et 7 %, respectivement. De plus, ce traitement a conduit à une teneur plus élevée en pigments chlorophylles (chlorophylle a, b et a + b et β-carotène) par rapport aux autres traitements et au témoin. Concernant les protéines des feuilles nous avons remarqué que le traitement avec GOD conduit à une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de protéines par rapport aux témoins. L'analyse biochimique a révélée également que les différents traitements de GOD ont affecté significativement la teneur en sucre soluble des feuilles.

Nous avons également étudié la cinétique de production d'un cocktail d'enzyme mélange de phosphatase acide, phosphatase alcaline et de protéase. Il a été constaté que le niveau le plus important de production de ce mélange est obtenu ave la souche B4 (720 U/ml). L'étude de la cinétique de production de B4 d'un hydrolysat de protéines par fermentation en milieu semi solide en utilisant différents substrats tels que la farine de poisson, la farine de fève, l'écorce de sésame, etc, a montré que la production maximale est : à pH6, T° 30°C, taille d'inoculum 5% et la farine de poisson comme substrat de base.

Concernant la production de l'acide gibbérellique (GA3), substance de croissance intervenant dans la régulation de la germination des graines, nous avons sélectionné trois souches dont la B28 qui présente le niveau de production le plus important soit 0.371g/l après 7 jours de fermentation. En milieu semi solide, l'étude de la cinétique de production de GA3 par la souche B28 a montré que le son de blé est le substrat de choix soit 5.2 g/kg de substrat après 6 jours de fermentation. L'effet de l'acide gibbérellique, dans une gamme étendu de concentrations, a été étudié sur la germination des graines de blé. Nous avons constaté qu'à : 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} et 10^{-4} M, l'acide gibbérellique stimule la germination des graines. Cependant, à la concentration 10^{-3} M, il manifeste un effet inhibiteur.

III. Production économique d'un complexe enzymatique par fermentation en milieu solide d'agro ressources et leurs applications comme additif en nutrition animale

Nous avons envisagé également de produire un cocktail d'enzyme pour dégrader les substrats telle que la matière ligno-cellulosique et les rendre plus digestibles. Parmi 32 souches nouvellement isolées, nous avons criblé deux souches Y3 (champignon) et Y6 (aspergillus) comme étant les plus performantes pour la production de xylanase, β-endoglucanase, mannanase et phytase. La cinétique de production de ces enzymes par Y3 et Y6 en milieu semi solide a montré qu'un maximum d'activité est obtenu après 72 heures de fermentation à 30°C (Y3) et 25°C (Y6). Plusieurs agro ressources tels que la paille d'orge, la paille d'avoine et les sons de blé, d'avoine et d'orge ont été testées. La production de ces enzymes par les deux souches est nettement supérieure avec le son de blé avec un maximum d'activité pour Y6 (xylanase : 85.92 U/gds, β-endoglucanase : 62.74 U/gds, mannanase : 47.70 U/gds et phytase : 8 U/gds) et Y3 (xylanase : 184.72 U/gds, β-endoglucanase : 27.12 U/gds et phytase : 7.14 U/gds). Afin de

caractériser les paramètres les plus significatifs qui affectent la production de ce cocktail d'enzymes, un plan de criblage (Placket & Burman) a été mis en place pour la souche Y6. Un plan d'optimisation type box Behnken a été appliqué par la suite en se basant sur les résultats du premier plan. L'analyse des résultats est en cours.

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**. Nous avons poursuivi, d'une part, 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*, et d'autre part, l'étude des voies de biosynthèses 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.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications internationales 2016

1. Farhat MB, Boukhris I, **Chouayekh H.** Development of cheap, eco-friendly and sustainable amendments to imrove plant growth**. *Atlas of Science January, 26* (2016).**

2. Naourez Ktari, Imen Trabelsi, Intidhar Bkhairia, Mehdi Triki, Mohamed A Taktak, Hafedh Moussa, Moncef Nasri and **Riadh B Salah (2016)**. Using Barley Beta Glucan, Citrus, and Carrot Fibers as a Meat Substitute in Turkey Meat Sausages and Their Effects on Sensory Characteristics and Properties. ***Journal of Food Processing & Technology*. DOI: 10.4172/2157-7110.1000620**

3. Ahlem Chakchouk-Mtibaa., Slim Smaoui., Imen Sellem., Soumaya Najah., Ines Karray-Rebai., **Lotfi Mellouli*** **(2016)**. Biopreservative Efficacy of Bacteriocin BacFL31 in Raw Ground Turkey Meat from the Point of Microbiological, Physico-chemical, and Sensory Qualities. Accepté pour publication in ***Biocontrol Science*** (**In press**)

4. IMEN SELLEM, FATMA KAANICHE, AHLEM CHAKCHOUK-MTIBAA, **LOTFI MELLOULI* (2016)**. Anti-oxidant, antimicrobial and anti-acetylcholinesterase activities of organic extracts from aerial parts of three Tunisian plants and correlation with polyphenols and flavonoids contents. ***Bangladesh Journal of Pharmacology*** 11, 531-544.

5. R. Medyouni1 • A. C. Mtibaa **• L. Mellouli** • A. Romerosa • N. Hamdi **(2016**). Convenient synthesis ofnovel unmetalled and metallophthalocyanines bearing coumarin derivatives: synthesis, characterization,

aggregation behaviors and antimicrobial activity. ***Incl Phenom Macrocycl Chem.*** DOI 10.1007/s10847-016-0655-7

6. Slim Smaoui, Anis Ben Hsouna, Aida Lahmar, Karim Ennouri, Ahlem Mtibaa-Chakchouk, Imen Sellem, Soumaya Najah, Mohamed Bouaziz, **Lotfi Mellouli*** (**2016**). Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic Mentha piperita used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. ***Meat Science 117, 196–204***

7. Imen Trabelsi, Naourez Ktari, Sirine Ben Slima, Kamel Bouchaala, **Riadh Ben Salah (2016)**. Effects of supplementation with *L. plantarum* TN8 encapsulated inalginate-chitosan in broiler chickens. ***International Journal of Biological Macromolecules 89, 677–681***

8. Ines Boukhris, Thierry Dulermo1, **Hichem Chouayekh** and Marie-Joëlle Virolle **(2016)**. Evidence for the negative regulation of phytase gene expression in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*. ***Journal of basic Microbiology***, 56, 59-66.

9. Ines Boukhris, Ameny Farhat-Khemakhem, Kameleddine Bouchaala, Marie-Joëlle Virolle and **Hichem Chouayekh (2016)**. Cloning and characterization of the first actinomycete b-propeller phytase from *Streptomyces* sp. US42. ***Journal of basic Microbiology***, 56, 1-10.

10. I. Trabelsi, N. Ktari, S. Ben Slima, K. Hamden and **R. Ben Salah (2016)**. Effect of a probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 strain on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. ***Journal of Animal Physiology and animal Nutrition*** **DOI: 10.1111/pn.12536.**

11. Nadia Bayar, Mouna Kriaa, **Radhouane Kammoun (2016)**. Extraction and characterization of three polysaccharides extractedfrom Opuntia ficus indica cladodes. ***International Journal of Biological Macromolecules 92, 441-450.***

FORMATION DIPLOMANTE

Thèses

Imen SELLEM : Doctorat de Spécialité en Sciences Biologiques de la F.S.S. soutenue le 23 / 12 / **2016**. **Titre**: Etudes Microbiologiques, Biochimiques, Physico-chimiques, Spectroscopiques et Toxicologiques de Biomolécules Naturelles **(Directeur de thèse Prof. Lotfi MELLOULI)**

Mastères professionnels

1. Marwa FRIJI « Optimisation de l'extraction enzymatique des pectines fonctionnelles à partir des raquettes de figue de barbarie » *Master en Industrie Agro-alimentaires de la faculté des Sciences de sfax* **Soutenue le 29/09/2016 (Encadrement Pr. R. Kammoun)**

2. Tahani BOUALLGUE & Mabrouka ACHOUR « Optimisation de l'extraction par ultrasons des pectines fonctionnelles à partir des raquettes de figue de barbarie » *Master Technologie Alimentaire de l'ISBS*, **Soutenue le 7/11/2016 (Encadrement Pr. R. Kammoun).**

PFE GBIII ENIS (pour l'obtention du diplôme d'ingénieur)

1. Ayoub BOUGHANMI. «Caractérisation d'une nouvelle souche de *Streptomyces* et purification partielle de ses métabolites secondaires bioactifs» **Soutenue à l'ENIS le 21 Juin 2016 (Encadreur Prof. Lotfi MELLOULI)**

2. Samir BEN SALEM « Effet de l'incorporation des probiotiques et prébiotiques sur la couleur, la qualité microbiologique, sensorielle et texturale de la Merguez de Bœuf ». **Soutenue à l'ENIS le 2 juillet 2016 (Encadrement Dr. Riadh BEN SALAH, M.C)**

3. Safa ADOUNI « Production de la Glucose Oxydase d'*Aspergillus tubingensis* CTM 507 en milieu semi solide : optimisation de la production et application comme biofertilisant » **Soutenue à l'ENIS le 23 juin 2016 (Encadreur Prof. Radhouane Kammoun).**

PROJETS SOUMIS EN 2016

- Un projet CMCU
- Un projet VRR
- Un projet Tuniso-Marocain

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

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 de Conférences	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
Fakher KAMOUN	Maître Assistant	ISBAM
Mehdi EL ARBI	Maître Assistant	ISBS
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 BERROUINA	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
Fatma ABDMOULEH	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Sonia MHIRI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Karima SALLEM	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Asmahen AKREMI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

Le LBMIE vise à mettre à la disposition du secteur économique des souches et des enzymes microbiennes d'intérêt industriels. Ces enzymes peuvent être obtenues par l'isolement de nouveaux microorganismes producteurs ou par une exploration fonctionnelle de métagénome permettant l'accès à l'information génétique des microorganismes environnementaux, cultivables ou non. Le crible d'enzymes par ces stratégies sera accompagné par une étude approfondie de leurs propriétés biochimiques, moléculaires et structurales. L'analyse moléculaire et structurale aidera à l'amélioration des performances de ces enzymes, si besoin, afin de mieux les adapter aux conditions d'applications industrielles. Les objectifs ultimes sont l'optimisation des

conditions de production ainsi que la formulation de certaines de ces enzymes et leurs tests dans des applications industrielles.

Les enzymes ciblées par ces études sont celles incorporées dans les détergents, exploitées en tannerie et en agroalimentaire. Sur un autre plan, nous participons à un programme de lutte contre le feu bactérien. Ainsi, nous utilisons les techniques microbiologiques, enzymatiques et moléculaires pour lutter contre l'agent pathogène, *E. amylovora.* Les travaux du LBMIE sont répartis en trois projets individualisés qui font partie du contrat programme du laboratoire 2015-2018. Par conséquent, des résultats obtenus au cours de l'année 2016 sont présentés suivant ces trois projets comme suit :

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

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

Responsables : Prof. Samir Bejar & Dr Aïda Hmida-Sayari
Membres impliquées: Dr N. Zaraî Jaouadi, 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, S. Mhiri & K Salem

Les travaux réalisés en 2016 étaient focalisés essentiellement sur le criblage, l'étude, l'amélioration et l'application de quelques enzymes destinées à la panification et pour l'alimentation animale.

1- Glucanases, xylanases et amylases pour alimentation animale et panification

a) Caractérisation biochimique et moléculaire d'une lichenase de B. pumilus US570

Dans un travail antérieur nous avons étudié la β-glucanase d'*A. niger* US368. En 2016, afin de proposer une glucanase bactérienne, susceptible d'être utilisée comme additif dans l'alimentation animale, nous avons isolé une souche bactérienne, identifiée en tant que *B. pumilus* US570 qui est productrice d'activité glucanase. La β-glucanase a été purifiée et étudiée. Elle possède une masse moléculaire apparente d'environ 25 kDa. Cependant, l'analyse par PAGE montre qu'elle possède une masse moléculaire d'environ 75 kDa ce qui suggère qu'elle est trimérique. L'enzyme est active dans une large gamme de pH avec une activité maximale à pH 6 et à 55 °C. Elle possède une bonne stabilité thermique avec un temps de demi-vie de 30 min à 80 °C. L'enzyme hydrolyse le β-glucane et le lichenane ce qui suggère que l'enzyme est une lichenase (EC 3.2.1.73). La séquence NH_2-terminale de la β-glucanase montre une identité importante aux lichenases du genre *Bacillus*. Le gène codant cette glucanase a été amplifié, cloné et séquencé (732 pb). Le modèle 3D comportant trois molécules de glucanase sous forme trimérique a été généré (**Fig. 1**).

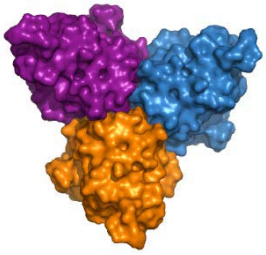


Figure 1: Représentation du complexe trimérique de GluUS570

b) Optimisation de la production, purification et caractérisation biochimique de l'activité xylanase de la souche Bacillus pumilus US570

Les xylanases ont suscité un intérêt de recherche considérable en raison de leurs applications industrielles potentielles dans l'alimentation animale et la fabrication du pain. Dans un travail antérieur nous avons étudié la xylanase d'*A. niger* US368 (Hmida-Sayari et al., 2012). En 2015, l'ADNc de la xylanase produite par ce champignon a été amplifié et exprimé dans *E. coli* BL21 (Elgharbi et al., 2015a) et a été également exprimée dans la levure *P. pastoris* (Elgharbi et al., 2015b). En 2016, nous avons utilisé la xylanase de la souche *B. pumilus* US570. L'optimisation de la production de l'activité xylanase, utilisant le plan d'expérience « Box Behnken » avec une combinaison de trois paramètres a permis une augmentation de l'activité xylanase de 25 à 75 U/ml. L'une des xylanases produite par la souche *B. pumilus* US570 a été purifiée *via* une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (25-60%) suivit d'un HPLC sur gel de filtration G200. Le poids moléculaire de la xylanase était 25 kDa. L'enzyme présente des optima de température et de pH respectivement de 55 °C et 6,5. L'enzyme ne présente pas d'activateur mais son action est inhibée en présence du Cu^{2+} et Mn^{2+}. La xylanase présente une bonne stabilité à des températures inférieures à 65 °C et à une large plage de pH et une efficacité catalytique élevée. Par conséquent, cette xylanase peut être un bon candidat pour diverses applications, en particulier dans les industries alimentaires et les aliments pour animaux.

2- Amylases améliorants de panification

a) Souche S2 d'Aspergillus oryzae

Dans le cadre de ce projet, nous avions isolé dans un travail antérieur une souche identifiée comme *A. oryzae S2* productrice d'amylases. Cette souche produit en milieu liquide 4 isoformes, AmyA, AmyB, B1 et B2 de tailles respectivement 50, 42, 40 et 43 kDa. AmyB, B1 et 2 proviennent d'un clivage chymotrypsique d'AmyA à partir de sites de clivage spécifique (Sahnoun et *al*. 2016). Une troisième forme dite AmyC est également détectée en fermentation semi-solide (FSS). Par ailleurs, nous avons cloné le gène codant AmyA et montré qu'elle renferme 8 introns et 9 exons qui coderaient pour une protéine de 500 aa.

Au cours de 2016, nous avons montré que AmyC est un tétramère de AmyB et que le modèle 3D d'AmyC montre une région nommée T2 impliquée dans l'oligomérisation. Les $t_{1/2}$ calculé pour AmyC à 50 ° C et 60 ° C sont de 85 min et 65 min, comparativement à 65 min et 10 min pour AmyB. L'efficacité catalytique d'AmyB (22.05×10^{-2} ml mg^{-1} s^{-1}) est supérieure à celle de l'AmyC (940.2 ml mg^{-1} s^{-1}) pour l'amidon. Cependant AmyC hydrolyse plus efficacement le G7, le G5 et le G qu'AmyB. Les Km calculées pour ces oligosaccharides courts ont montré qu'AmyC présente une affinité 2 fois plus élevée qu'AmyB. Les études *in silico* montre que cette efficacité de liaison de l'AmyC envers le substrat court est due à une dominance des interactions de type hydrogène et hydrophobe entre deux unités AmyB.

b) Amylase de la souche US586 de Bacillus subtilis

Une souche bactérienne a été isolée et identifiée en tant que *B. subtilis*. Un maximum de production d'activité amylolytique (7 U/ml) pour amy586 a été obtenu après 16 h sur milieu optimisé par les plans d'expériences. L'optimum de l'activité est obtenu à pH 4 et à 60 °C sur l'amidon. L'enzyme garde plus que 80% de son activité après au moins 45 min d'incubation à 55 °C. En plus, l'étude des produits d'hydrolyse montre que l'enzyme génère le maltose et le maltotriose à partir de l'amidon ce qui rend cette enzyme prometteuse pour une application en

panification. D'autre part, le gène amy586 de taille 1.9 kb codant cette activité enzymatique a été amplifié, cloné, séquencé et exprimé chez *E. coli*. La purification de l'enzyme sauvage et recombinante est en cours et le test de ces activités en panification en tant qu'améliorant ou comme agent anti-rassissant est l'objectif immédiat de ce travail.

3- Exploration par métagénomique fonctionnelle du microbiote intestinale du Dromadaire pour le screening d'enzymes pour l'alimentation animale et pour la dégradation des lignocelluloses.

a) Rappel des résultats antérieurs

Ce nouveau projet vise à appliquer la stratégie d'exploration fonctionnelle du microbiote digestif du dromadaire, pour découvrir de nouvelles carbohydrolases efficaces pour l'alimentation animale et pour la dégradation des lignocelluloses. Dans des travaux antérieurs, nous avons préparé de l'ADN métagénomique des fèces de dromadaire. Cet ADN a servit pour amplifier des gènes 16S suivit de la séquence par le NGS ce qui nous a permis d'avoir une idée globale sur la diversité de ce microbiote. La majorité des espèces bactériennes appartient aux phyla de Bactéroidetes et Firmicutes avec une bonne proportion de bactéries non classifiées. Par ailleurs, l'ADN métagénomique a servit également pour préparer plusieurs banques fosmidiques métagénomiques.

b) Criblage Haut débit de la banque métagénomique fécal de Dromadaire

La meilleure banque contenant environ 17000 clones a été criblée en haut débit en collaboration avec la LISBP (Toulouse, France) utilisant des substrats lignocellulosiques chromogènes. Les résultats obtenus nous ont permit de valider de nombreux clones positifs qui sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Récapitulation des résultats du criblage haut débit sur différents substrats

Clone	Activités révélées	Nbre /taille des contigs	ORF les plus significatives
26H3	Cellulase/Mannanase	1 / 24131 pb	Acetylxylanesterase/Cellulase/Mannanendo-1,4-beta mannosidase/ glycoside hydrolase prédite/ Beta-glucosidase/ Cellobiose phosphorylase
36A23	Glucanase/Mannanase	1 /31146 pb	Glycoside hydrolase prédite/ Beta-xylosidase/Mannan endo-1,4-beta-mannosidase/Beta-1,4- mannanase-précurseur /Sialic acid-specific9-o-acetylesterase
6L6	Cellulase	1 /43704 pb	précurseur de mannan endo-1,4-beta-mannosidase/ précurseur d'endoglucanase/ précurseur d'endo-1,4-beta-xylanase/Cellobiose phosphorylase
10H13	Cellulase/Glucanase	2/ 24089-17030 pb	Précurseur d'endo-1,4-beta-xylanase /Cellobiose phosphorylase/ Mannan endo-1,4-betamannosidase/ Cellulase/Endo-1,4-beta-mannosidase
24P15	Ligninases	2 / 22926-1225pb	Thiol peroxidase, Bcp-type (EC 1.11.1.15);Catalase (EC 1.11.1.6) / Peroxidase (EC 1.11.1.7); Xylanase; Cellulase; Phosphatase; Estérase
37M5	Ligninases	1 / 8812 pb	Thiol peroxidase, Bcp-type (EC 1.11.1.15) ; Perméase; Estérase; Peptidase; Déhydrogenase

c) Séquences et Analyse de quelques clones et découvertes de nouveaux clusters impliqués dans la dégradation de la matière lignocellulosique

Suite à ce criblage, un certain nombre de clones a été sélectionné pour le séquençage haut débit par le NGS. Des analyses bioinformatiques des séquences sont par la suite effectuées y compris l'assemblage des « reads » obtenus et l'annotation fonctionnelle des séquences. Cette annotation nous a permis d'identifier des gènes codants pour des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de la matière lignocellulosique. Les contigs ainsi que les ORFs les plus significatifs sont rapportés dans le tableau ci après.

Substrat	AZO-CM Celluloe	AZCL Carob galactomannan	AZCL Barley B glucan[a]	AZCL Xyloglucan[b]	AZCL-HE Cellulose[b]	Tween
Clone positive	17	11	5	13	5	12

Tableau 2: Caractéristiques des différents clones séquencés.

d) Analyse détaillée des clones 26H3 et 36A23

Les clones 26H3 et 36A23 montrant des activités intéressantes ont été sujets à une étude plus approfondie. Le clone 26H3 est actif sur l'AZO-CM cellulose, l-AZCL Carobgalactomannan et le Tween20 alors que le clone 36A23 présente une activité sur l-AZCL carobgalactomannan et sur l'AZCL barleyβ-glucan. L'annotation fonctionnelle a permis d'identifier deux clusters de gènes impliqués dans la dégradation des parois des plantes incluant une machinerie d'endo et d'exo glycosides hydrolases, des estérases, des phosphorylases et des transporteurs membranaires. La comparaison des protéines codées par ces gènes avec les protéines des banques de données montre des identités relativement faibles (25 à 73%), dénotant l'originalité de ces gènes. L'annotation taxonomique révèle qu'ils sont issus d'organismes non connus appartenant au phylum de bacteroidetes/chlorobi.

En 2016, ce projet a donne lieu à 6 articles publiés et 1 brevet d'invention INNORPI.

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 Jaouadi, Dr H. Ben Hlima, Dr F. Kamoun, Dr F. Frikha & Dr D. Ayadi Zouari

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

Grâce aux progrès récents dans les biotechnologies, l'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et entrouvre des perspectives étonnantes. En effet, l'utilisation des enzymes devient une solution pour remplacer les produits chimiques polluants et toxiques, traditionnellement utilisés dans l'industrie. Ce projet comporte plusieurs parties qui s'articulent autour de deux thématiques d'enzymes microbiennes notamment les hydrolases (protéases, peptidases, élastases, subtilisines et kératinases) et les oxido-réductases (peroxydases à acides humiques HaP, de lignine LiP et de manganèse MnP) d'intérêt industriel dans la formulation des détergents de lavage (textile) et dans le traitement du cuir (tannerie). Il s'agit de mettre à la disposition du secteur économique des enzymes microbiennes (hydrolases et oxido-réductases) pour les dites applications.

1- Les hydrolases microbiennes (protéases, peptidases, élastases, subtilisines et kératinases)

De nos jours, les hydrolases notamment les enzymes protéolytiques 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 en tannerie.

a) Etude de nouvelles hydrolases issues des souches pétrolières dans la détergence et la synthèse peptidique: cas des protéases SPVP et SPALF

Dans le cadre d'une collaboration avec Pr M. CHEMKHA (LBPE-CBS), deux souches nommées VP3 d'*Aeribacillus pallidus* et C250R de *Lysinibacillus fusiformis* ont été isolées à partir d'un champ pétrolier géothermique (Ramoura) du TPS "Thyna Petroleum Services", situé à 11 Km au nord-ouest de la ville de Sfax, ont été retenues pour leurs activités protéases très intéressantes. Deux nouvelles protéases à sérine nommées SPVP et SAPLF ont été purifiées et caractérisés à partir des souches VP3 et C25R, respectivement. L'analyse par SDS-PAGE montre que les enzymes purifiées présentent des masses moléculaires apparentes de 29 et 51 kDa. Les activités spécifiques sont de 58000 et 94333 U/mg à pH 10 et à 60 °C (SPVP) et 70 °C (SAPLF). Le séquençage de leur extrémité NH2-terminale (25 et 27 aa), montre une forte homologie avec les protéases à sérine de *Bacillus*. Les deux protéases se distinguent par une large spécificité vis-à-vis des substrats protéiques et elles sont douées d'une meilleure efficacité catalytique et stabilité remarquable en présence de divers solvants organiques et une compatibilité importante avec les détergents de lavage en comparaison avec les protéases commerciales (Alcalase Ultra 2,5 L et Thermolysine). Ainsi, les deux protéases SPVP et SAPLF semblent répondre à la majorité des exigences de bonnes protéases pour la formulation des détergents et la synthèse peptidique.

b) Propriétés biochimique et moléculaire d'une nouvelle kératinase nommée KERDZ produite par la souche d'actinomycète DZ50 d'Actinomadura viridilutea, ayant un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique très importants

Dans le cadre du projet de recherche Tuniso-Algérien, durant l'année 2016, nous avons déterminé les propriétés biochimiques et moléculaires d'une nouvelle sérine kératinase nommée KERDZ produite par une souche d'actinomycète DZ50 *d'A. viridilutea* ayant un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique très importants par rapport aux trois kératinases de références: la KERAK-29 produite par *A. keratinilytica* Cpt29, l'Actinase E (ou Pronase E) produite par *Streptomyces griseus* et la KERAB produite *Streptomyces* sp. AB1. L'enzyme purifiée possède une masse moléculaire estimée à 20 kDa par SDS-PAGE. Son optimum d'activité est obtenu à pH 11 et à 80 °C. Sa thermoactivité et sa thermostabilité sont considérablement améliorées par le calcium à 2 mM. Le gène *kerDZ* codant la nouvelle kératinase KERDZ a été cloné, séquencé et exprimé dans *E. coli*. Ces propriétés ont montré que la souche *A. viridilutea* DZ50 (à travers son kératinase), présente une activité kératinolytique qui semble être intéressante et pourra être utilisée avec succès dans la valorisation des déchets à base de kératine et dans le traitement de cuir.

2- Les oxido-réductases microbiennes (peroxydases à acides humiques HaP, de lignine LiP et de manganèse MnP) d'intérêts biotechnologiques et environnementaux pour la détergence et pour le traitement des acides humiques

Ce nouveau projet vise à produire et à mettre à la disposition de l'industriel des détergences, des peroxydases pouvant être utilisées comme agent de blanchissement 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 et d'autre part, dans les étapes de traitement de finition pour éliminer les acides humiques présents dans les eaux potables. Dans le cadre du projet de recherche Tuniso-Algérien, et durant l'année

2016, nous avons purifié et caractérisé trois nouvelles peroxydases nommées MnP BA30 et LiP BA45 à partir de la souche de basidiomycète CX-9 de *Bjerkandera adusta*, isolée à partir du jardin du Ruines Romaines de Tipaza et MnP TP55 à partir de la souche de basidiomycète *Trametes pubescens*, isolée à partir du port de pêche de Salamandre (Mostaganem, Algérie). Elles s'agissent de trois protéines monomériques ayant une masse moléculaire apparente de 30, 45 et 55 kDa et possède des valeurs de Reinheitzahl (RZ) de 2,1 1,85 et 1,71, respectivement. Ces enzymes présentent des activités peroxydasiques révélées sur zymographie utilisant l'o-dianisidine. La caractérisation biochimique des enzymes purifiées nous a permis de conclure que les optima de pH et de température sont de 3 et 70 °C (MnP BA30), 4 et 50 °C (LiP BA45) et de 5 et 40 °C (MnP TP55) sur 2,4-DCP. Ils s'agissent des hémoperoxydases qui catalysent l'oxydation d'une large gamme de substrats en présence de H_2O_2. Ces enzymes sont inhibées par l'azide de sodium et le cyanure, ce qui indique la présence des composants de l'hème dans leur structure tertiaire. Les trois enzymes obéissent à la cinétique de Michaelis-Menten et montre des valeurs d'efficacité catalytique élevées de même que celles des peroxydases HaP4, LiP-SN et HRP. La MnP-TP55 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 ces peroxydases 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 2016, ce travail a abouti à la publication de 4 articles et de 5 brevets d'invention INNORPI. En plus du renouvellement du projet Tuniso-Algérien et l'acceptation d'un projet PNRI.

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

Responsable : Dr Mamdouh BEN ALI
Chercheurs impliquées: Dr M. El Arbi, Dr Hmida-Sayari & Dr M. Ben Ali
Doctorants mobilisés: L. Daoud, H. Hmani, A. Hadj Brahim, F. Abdmouleh & A. Akremi

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 les résultats sont encore préliminaires. Cependant, au cours de 2016-2017, nous avons réussit l'isolement de plusieurs souches *Erwinia amylovora* à partir de plusieurs endroit touchés par le feu bactérien. Ces souches sont entrain d'être identifiées et classifiées afin de déterminer leurs phylogénies et leurs relations potentielles avec la pathogénicité. Cette collection de souches constituera la base pour les études futures.

La recherche d'antagoniste bactérien n'a pas aboutit jusqu'à lors à un isolat efficace et la recherche est en cours.

Par ailleurs, nous avons pu isoler plusieurs bactériophages d'*Erwinia amylovora* à partir de plusieurs biotopes. Parmi ces phages 11 ont montré une spécificité pour les souches d'*Erwinia* isolés et donnent des plages de lyse très importantes. L'identification de ces bactériophages et l'étude de leurs spécificités sont en cours.

Dans le cadre d'anticiper la lutte contre *Erwinia amylovora* nous avons préparé un cocktail de 5 phages isolés sur une parcelle de poire infecté au centre technique des agrumes. Sur cette parcelle nous avons étudié l'impact de la pulvérisation de ce cocktail (issue de la parcelle) sur des arbres infectés à différents stades et les résultats préliminaires sont très encourageants dans la mesure où l'infection a été bloquée et les arbres ont pu dominer l'infection par comparaison à une parcelle témoin.

Production scientifique et diplomante, Conventions et Collaborations

1- Publications parues en 2016 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture et à IF

1. **M. Ben Elhoul, N. Zaraî Jaouadi, H. Rekik, M. Omrane Benmrad, S. Mechri, E. Moujehed, S. Kourdali, M. El Hattab, A. Badis, S. Bejar & B. Jaouadi (2016).** Biochemical and molecular characterization of new keratinoytic protease from a marine thermophilic actinomycete *Actinomadura viridilutea* strain DZ. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 92; 299-315.
2. **M. Omrane Benmrad, E. Moujehed, M. Ben Elhoul, N. Zaraî Jaouadi, S. Mechri, H. Rekik, S. Kourdali, A. Badis, S. Sayadi, S. Bejar & B. Jaouadi (2016).** A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 91; 961-972.
3. **K. Bouacem, A. Bouanane-Darenfed, N. Zaraî Jaouadi, M. Joseph, H. Hacene, B. Ollivier, M-L. Fardeau, S. Bejar & B. Jaouadi (2016).** Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 86; 321-328.
4. **S. Mouna, J. Sonia, T. Sahar, L. Ayadi & B. Samir (2016)**. *Aspergillus oryzae* S2 α-amylase domain C involvement in activity and specificity: in vivo proteolysis, molecular and docking studies. ***PLoS ONE* 11(4), e0153868.**
5. **S. Mouna, M. Kriaa, S. Besbes, M. Attia, R. Ben Hmida, M. Jardak, S. Bejar & R. Kammoun (2016).** Optimization of *Aspergillus oryzae* S2 α-amylase, ascorbic acid and glucose oxidase combination for improved French and composite Ukrainian wheat dough properties and bread quality by a mixture design approach. ***J. Food Sci. Biotechnol.*** 5; 1291-1298.

6. **B. Naili, M. Sahnoun, S. Bejar & R. Kammoun (2016).** Optimization of submerged cost-effective *Aspergillus oryzae* S2 α-amylase production. ***Food Sci. Biotechnol.*** 25; 185-192.
7. **S. Jemli, M. Jaoua & S. Bejar (2016).** US132 cyclodextrin glucanotransferase engineering by random mutagenesis for an anti-staling purpose**.** ***Mol. Biotechnol.*** 58; 551-557.
8. **S. Sellami, S. Jemli, N. Abdelmalek, E. Dabbéche & K. Jamoussi (2016)**. Localization and in silico study of the vegetative insecticidal proteins Vip2S-Vip1S of *Bacillus thuringiensis*. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 91; 510-517.
9. **Zghal, Raida Zribi, Elleuch Jihen, Ben Ali Mamdouh, Darriet Frédérique, Rebai Ahmed, Chandre Fabrice, Jaoua Samir & Tounsi Slim (2016)** "Towards novel Cry toxins with enhanced toxicity/broader: a new chimeric Cry4Ba/Cry1Ac toxin." ***Applied Microbiology and Biotechnology*** (2016): 1-10.
10. **M. El Arbi, K. Jalléli, F. Trigui, P. Pigeon, M. Görmen, S. Top, S. Aifa, I. Fliss, G. Jouaen & R. Hammami (2016).** Efficacy of a novel ferrocenyl diaryl butene citrate compound as a biocide for preventing healthcare-associated infections. ***Med. Chem. Comm***, 7; 948-954.

2- Articles/chapitres d'ouvrages scientifiques parus en 2016

1. **Chiraz Gorgi Hila (Ing. Principal au CNCC, DRIL) & Bassem JAOUADI (MC au LBMIE-CBS).** « Les résultats de recherche du projet «PNRI-ENZYME : CNCC-CBS-FSS-SO.SA.CUIR. **12 janvier 2016** dans la page 9 du « **Cuir News N°116 Oct-Nov 2015**»

3- Brevets d'inventions déposés (INNORPI et autres organismes internationaux)

1. **S. Mechri, M. Kriaa, M. Ben Elhoul Berrouina, M. Omrane Benmrad, N. Zaraî Jaouadi, H. Rekik, E. Moujehed, A. Chebbi, S. Sayadi, M. Chamkha, S. Bejar & B. Jaouadi**. Optimisation de la production, par méthodologie des plans d'expériences, et détermination des propriétés d'une nouvelle protéase (nommée SAPLF) de la souche C250R de Lysinibacillus fusiformis d'intérêt industriel. Brevet d'Invention **INNORPI TUNISIE déposé le 07 Octobre 2016 N° TN2016/0429**.
2. **M. Omrane Benmrad, M. Ben Elhoul, N. Zaraî Jaouadi, S. Mechri, S. Kourdali, A. Badis, S. Bejar & B. Jaouadi.** Criblage, purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle sérine protéase nommée SPTC produite par une souche de Basidiomycète *Trametes cingulata* CTM 10101 tolérante en présence des solvants organiques et active dans les détergents de lavage. Brevet d'Invention **INNORPI TUNISIE TN2016/00165.**
3. **H. Rekik, N. Jmal, N. Zaraî Jaouadi, F. Gargouri, M. Ben Elhoul, S. Mechri, S. Bejar & B. Jaouadi.** Une nouvelle protéase nommée SAPRH produite par la souche de *Bacillus safensis* RH12: candidate efficace et stable dans les produits de détergence ayant une efficacité catalytique très importante par rapport aux enzymes commerciales. **Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE N° TN 2016-0426.** Co-Propriétaires : CBS & ETS JMAL « EJM »
4. **M. Ben Elhoul, N. Zaraî Jaouadi, H. Rekik, M. Omrane Benmrad, S. Mechri, S. Kourdali, M. El Hattab, A. Badis, S. Bejar & B. Jaouadi.** Propriétés biochimique et moléculaire d'une nouvelle sérine kératinase nommée KERDZ produite par une souche d'actinomycète *Actinomadura viridilutea* DZ50 ayant un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique très importante par rapport aux enzymes commerciales. **Brevet d'Invention INNORPI N° TN 2016/0433.**
5. **R. Ameri, S. Trabelsi, M. Mezghani, E. Laville, G. Potocki- Veronese, A. Hmida-Sayari, F. El Gharbi & S. Bejar.** Séquence nucléotidique à partir d'une banque métagénomique de microbiote intestinal du dromadaire incluant un cluster de gènes codant des enzymes originales pour l'alimentation animale et la dégradation de lignocelluloses. **Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE N° TN 2016/0332.**
6. **L. Daoud, H. Hmani Ben Moussa, A. Hadj Ibrahim, S. Bejar & M. Ben Ali.** Enzymes protéolytiques alcalines thermoactives et halotolérantes, douées d'activité kératinolytique, pour la détergence, la synthèse peptidique et la biodégradation des substrats riches en kératine**. Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE N° TN 2016/0424.**

4- Liste des habilitations universitaires et agrégations hospitalo-universitaires soutenues en 2016

1. **Aida Hmida-Sayari**: Titre : « *Xylanase, beta glucanase et phytase microbiennes pour applications biotechnologiques: Caractérisations biochimique et moléculaire* ». **Habilitation Universitaire en Génie Biologique, ENIS – Université de Sfax: soutenue le 16/04/2016**

5- Mastères de recherche soutenus

1. **Emna MOUJEHED:** Titre : « *Purification et caractérisation d'une protéase fongique destinée au traitement des taches protéiniques sur supports textiles* ». Spécialité : **Biotechnologie Microbienne / Faculté des Sciences de Sfax – Université de Sfax: Soutenue le 16/11/2016).**
2. **Sonia Mhiri** : Titre : «*Optimisation de la production, purification et caractérisation biochimique de l'activité xylanase de la souche Bacillus pumilus US570*». Spécialité : **Génomique et protéomique / FSS – Université de Sfax: Soutenue le 02/12/2016.**
3. **Ahlem Ben Massoud :** Titre : «Probiotique et elevage : Essai d'application dans le domaine avicole». Spécialité : **Biotechnologie Microbienne / FSS – Université de Sfax: Soutenu le 21/09/2016.**

6- Organisation de manifestations scientifiques

- Organisation du "Maghrebian-Finnish Biotechnology Symposium 2016 **(MFBS 2016):** LBMIE/CBS, LPE/CBBC & LMET/INSAT (Tunisie), & Juva Truffle Center (Finlande), l'A.T.Biotech. & l'Ambassade de Finlande en Tunisie et en Lybie, **19-22 Mars 2016 à Hammamet - Co Chairman** : Pr S. Bejar; **Membres du Comité d'organisation:** Pr A. Sayari, Dr M. Ben Ali, Dr B. Jaouadi, Dr A Hmida-Sayari & Dr N. Zaraî Jaouadi

- Organisation des **Journées Internationales de Biotechnologie (JIB 2016)** de l'A.T.Biotech. du 18 au 22 décembre 2016 à Sousse, Tunisie. **Membres du comité d'organisation:** Pr S. Bejar, Pr A. Sayari et Dr B. Jaouadi

7- Conventions/contrats signés en 2016 avec des partenaires socio-économiques nationaux

Projet PNRI-KER-LIP » 2016-2018 : «Développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de traitement des peaux ovines : reverdissage, épilage-pelanage et dégraissage enzymatiques » Montant du financement : 79 500 DT pour tout le projet et pour la partie allouée pour le LBMIE-CBS: **Projet accepté le 05 octobre 2016.**

8-Conventions signées en 2016 dans le cadre des projets de coopération scientifique bilatérale.

Projet de Recherche-Formation conjoint bilatéral 2012-2017 Tuniso-Algérien « TNDZ-MicrooZymes JAOUADI/BADIS»: «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 2016 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 (CBS), Saber Masmoudi (CBS), Hammadi Ayadi (Technopole Sidi Thabet)

Maitre-Asistants: Najla Kharrat (CBS), Sami Mnif (CBS), Mariem Ben Said (CBS), Mohamed Ali Mosrati (CBS), Dorra Idris (CBS), Adel Tekari (CBS)

Imen Ayedi (FSS), Salima Belguith-Maalej (ISBS), Imen Benrebeh (FSGabès), Leila Ayedi (IPEIS), Boutheina Cherif (ISBS), Heni Bouhamed (FSEGS), Lobna Bouchaala (ENETCOM), Soumaya Triki (ISBBeja).

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, Imen Chakchouk

Etudiants en thèse : Karim Jalleli, 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

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

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

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

Maladies cardiovasculaires : La première action consiste à étudier l'association entre les facteurs de risque environnementaux et les biomarqueurs inflammatoires impliqués dans la sévérité de l'atteinte coronaire dans le syndrome coronarien aigu. Nous avons recruté un échantillon de patients répartis selon quatre stades :

- Témoins : 30 patients ayant un réseau coronaire angiographiquement sain.
- NESTEMI : Non-ST- Elevation Myocardial Infarction
  - 25 patients ayant angor instable (ST- trop -).
  - 35 patients ayant infarctus de myocarde (IDM) sous endocardique (ST- trop +).
  - STEMI : ST- Elevation Myocardial Infarction
  - 40 patients ayant IDM épicardique (ST+).

Les données cliniques de malades ont été collectées à partir de dossiers cliniques. Une fiche clinique a été établie pour chaque patient à fin de déterminer : l'âge et le sexe, les antécédents, les facteurs de risque (Diabète, Hypertension, Dyslipidémie, Tabac et antécédents familiaux), la présence ou l'absence de traitement, le statut coronaire, les paramètres biologiques (les concentrations sériques du glucose, triglycérides, cholestérol, acide urique, urée et troponine etc). Une autre fiche contenant les données démographiques, socio. Nous avons effectués des dosages biochimiques : dosage des protéines totales par la méthode Bradford, dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase et le dosage de l'activité enzymatique du Superoxyde Dismutase. Bien que la taille de l'échantillon soit relativement faible, nous retrouvons les mêmes facteurs de susceptibilité à la maladie que ceux rapportés dans la littérature. Durant l'année 2016 nous avons achevé la mise au point des techniques de dosage des activités antioxydantes et démarré les autres parties.

Cancer du sein : La seconde action porte sur le cancer du sein de la femme jeune ; l'expression de 6 bio-marqueurs a été testée dans une série de 170 patientes. L'analyse des données a montré la valeur pronostique de trois biomarqueurs, à savoir le Bcl2, Ki67 et P53.

Les endocrinopathies : ce ont des maladies qui se traduisent par une hyper ou hypofonctionnement d'une ou de plusieurs glandes endocrines. Dans certaines situations, les formes extrêmes d'absence de la glande ou de prolifération tumorale pourraient illustrer les limites de l'éventail de manifestations cliniques et biologiques de ces pathologies. Dans ce projet nous avons choisi les maladies auto-immunes thyroïdiennes (MAIT), le diabète monogénique (MODY) et l'insuffisance hypophysaires comme cibles d'exploration. L'objectif principal de cette partie du projet est de décortiquer le réseau moléculaire responsable de l'émergence de ces pathologies au niveau génétique et/ou transcriptomique.

<u>Exploration du transcriptome de thyréocytes de patients atteints de MAIT</u> **:** Durant ce projet, des thyréocytes en culture de patients atteints de la maladie de Basedow (la forme commune de l'hyperthyroïdie auto-immune) ont été soumises à des stimulations par différentes doses de thyroglobuline en absence et en présence de TSH. Ces travaux nous ont amené à préparer une cinétique cellulaire récupérée après 6h, 12h, 24h, 48h, 72h et 96h de culture. Les extraits d'ARN des différentes cultures ont été préparés pour une étude transcriptomique à haut débit par biopuce. Les manips ont été entamées et une analyse différentielle est en cours d'exploration. Les groupes de gènes dont l'expression est perturbée par la stimulation feront l'objet d'une analyse fonctionnelle spécifique au niveau transcriptomique et protéomique à fin de comprendre les pathologies moléculaires des MAIT.

<u>Génétique moléculaire des endocrinopathies monogénique</u> *:*Deux modèles de pathologies endocriniennes monogéniques ont été choisis à savoir le diabète monogénique (MODY) et l'insuffisance hypophysaires monogénique. L'objectif principal de cette partie est d'identifier les

biomarqueurs responsables de la transmission de ces pathologies. Une approche qui va nous permettre de comprendre mieux le réseau moléculaire de plusieurs pathologies métaboliques multifactorielles ; particulièrement le retard de croissance et le diabète type2. 15 familles atteintes ont été recensées et analysées par séquençage direct (Sanger) des gènes candidats et/ou par la nouvelle génération de séquençage (NGS). Plusieurs variants ont été répertoriés après la validation de la transmission familiale et la détermination de leurs fréquences dans la population générale. En total, 9 exomes (5 partiels et 4 totaux) ont été lancés. Des analyses sont en cours, 4 familles atteintes de l'insuffisance hypophysaire sont déjà classées (gène PROP1 et KISS1R) et deux exomes sont en cours d'analyse pour l'identification de nouveaux gènes. Pour le MODY, les gènes candidats ont été analysés révélant plusieurs variants de susceptibilités. Cependant, l'hypothèse de l'implication de nouveaux gènes n'est pas totalement rejetée.

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

Mise en place d'un deuxième modèle de biofilm microbien: Après avoir construit un premier modèle fiable et reproductible de biofilm bactérien stable et mature moyennant l'utilisation de la souche *S. epidermidis* S61, un deuxième criblage de souches filmogènes à partir de film microbien contaminant les équipements industriels a été mis au point. L'étude a été consacrée à l'isolement et la sélection de souches microbiennes productrices de biofilm à partir d'échantillons de films microbiens. Une évaluation des activités d'éradication de ces biofilms par deux détergents a été réalisée en modèle statique. 78 souches ont été isolées à partir de quatre échantillons (A1, A2, B1 et B2). L'étude de la formation des biofilms moyennant la révélation avec le cristal violet nous ont permis de sélectionner six souches (6B1, 7B1, 20B1, 23B1, 27B1 et 28B1) comme les souches les plus filmogènes. La viabilité cellulaire au sein des biofilms formés a été estimée moyennant le test à la résazurine. Les résultats ont montré que l'addition du glucose augmente cette viabilité. L'étude de l'activité anti-biofilm de deux détergents fréquemment utilisés dans la technique NEP par l'éradication des biofilms ainsi formés a montré des résultats variables qui dépendent de la souche microbienne étudiée. Globalement, la soude parait être plus efficace que l'acide nitrique pour la majorité des souches, à l'exception des souches 20B1 et 27B1, avec des pourcentages d'éradication qui ont pu dépasser les 90%. Une étude en modèle dynamique est en cours de réalisation.

Les micro-organismes endophytes producteurs de molécules à activité anti-biofilm : La collection de microorganismes endophytes a été élargie par l'isolement de bactéries et de champignons endophytes à partir de plantes localisées dans différentes régions de la Tunisie. Le criblage des activités anti-biofilms des extraits organiques de ces micro-organismes endophytes et l'essai de purification des molécules responsables de cette activité nous a permis de sélectionner les souches potentiellement intéressantes et qui sont des synthétiseurs de molécules qui pourraient avoir diverses applications en relations avec le problème des biofilms microbiens et leurs effets néfastes dans le domaine de la santé et dans l'agroalimentaire. Un exemple de souche fongique intéressante est la souche 32AR qui a été isolée à partir de la plante *S. sempervirens* et qui produisait des molécules bioactives. Les pics intéressants ont été identifiés après avoir écarté le bruit de fond du milieu de culture (Figure 1 et tableau 1).

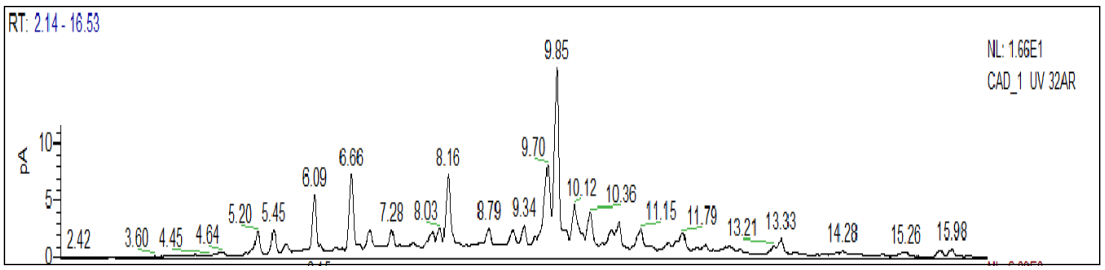


Fig. 1 : Chromatogramme mettant en évidence les composés caractérisés dans l'extrait organique de la souche 32AR.

Les huiles essentielles et leurs activités anti-biofilms : Les huiles essentielles sont bien reconnues dans le domaine de la santé par leurs effets bénéfiques et leurs activités biologiques intéressantes. Cependant, les activités anti-biofilms de plusieurs huiles essentielles produites à partir de plusieurs plantes restent peu ou pas étudiées. Dans ce cadre, 5 huiles essentielles ont été choisies pour tester leurs activités anti-adhérentes et anti-éradication de biofilms bactériens tout en déterminant leurs compositions chimiques respectives. Les résultats ont montré que globalement ces huiles ont des activités anti-biofilm intéressantes avec des capacités d'inhibition de l'adhérence bactérienne qui ont pu dépasser les 90% et des pouvoirs d'éradication moins efficace (de l'ordre de 50%). Ces activités ont pu être visualisées par microscopie à fluorescence (Fig.2).

Tableau 1 : La liste des composes caractérisés par RP-HPLC-ESI-MS en utilisant le mode d'ionisation positif et négatif (Souche 32AR)

			Molecular ions (m/z)			
Pics	TR	Formule moléculaire	Ionisation négative	Ionisation Positive	fragmentation et ions adduits	Molécules possibles
1	13.33	C24H46O6	[M-H]= 429.321	[M+H] = 431.336	[2M-H]= 859.650 [2M+Na]= 883.645	Inconnu
2	10.80	C18H34O4	[M-H]= 313.237		[2M-H]= 627.481 [M-H2O+H]=297.231	7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoicacid penicitide A
3	10.12	C18H32O4	[M-H]= 311.222			piliferolide C filoboleticacid hygrophoron A12
4	9.85	C26H31O5N3	[M-H]= 464.218	[M+H]= 466.233	[M+Na]= 488.215	notoamide K notoamide M 17-epi-notoamide M
5	9.70	C26H29O3N3	[M-H]= 430.212	[M+H]= 432.227	[M+Na]= 454.209 [2M+H]= 863.447 [2M+Na]= 885.430 [M+AF-H]= 476.218	stephacidin A 6-epi-stephacidin A (−)-enamide
6	8.16	C24H36O6N4	[M-H]= 475.255		[M+Na]= 499.252 [M+NH4]= 494.299 [2M+Na]= 975.522	Inconnu
7	6.66	C13H14O4	[M-H]= 233.080	[M+H]= 235.096	[2M-H]= 467.1697	nigerapyrone C sclerin pyrenochaeticacid A
8	6.09	C13H16O5	[M-H]= 251.092	[M+H]=253.10		dihydrocitrinin pyrenochaeticacid B

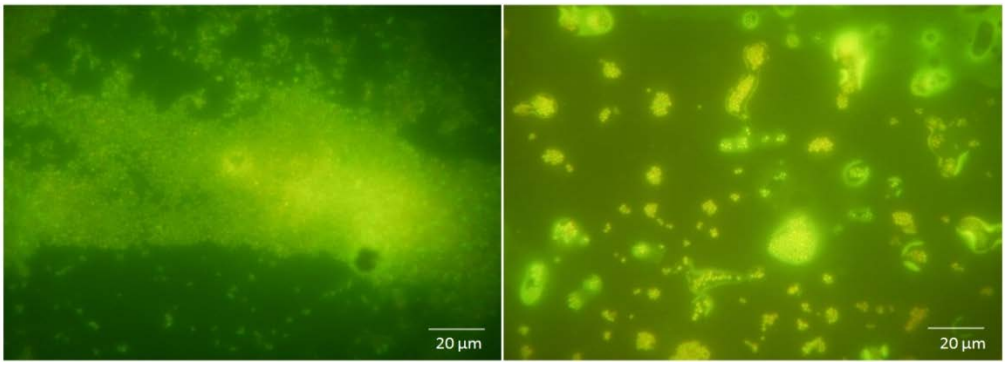
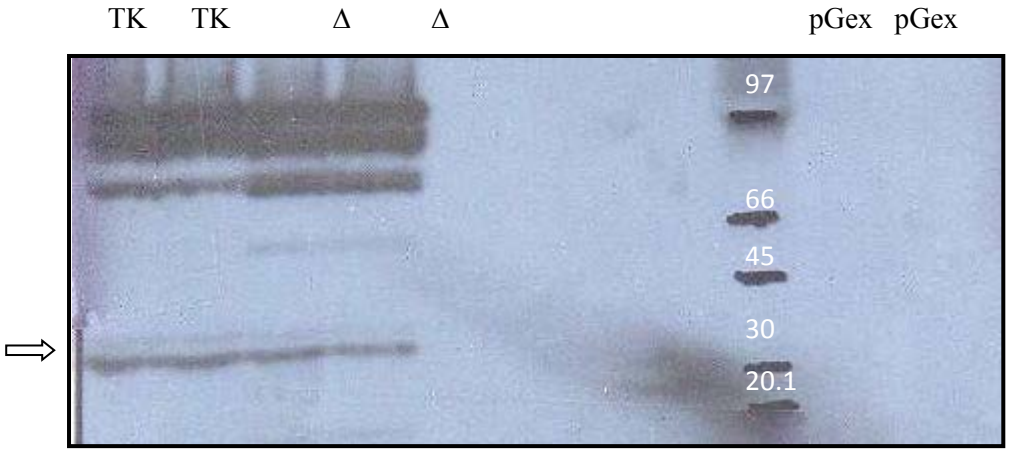


Fig. 2. Microscopie à fluorescence montrant des lamelles à biofilms.

Les biofilms sont marqués avec le AO. Les Barres correspondent à 20 µm A: biofilm de S61, lamelle contrôle ; B: S61 biofilm traité avec 50 µl/ml d'une huile essentielle.

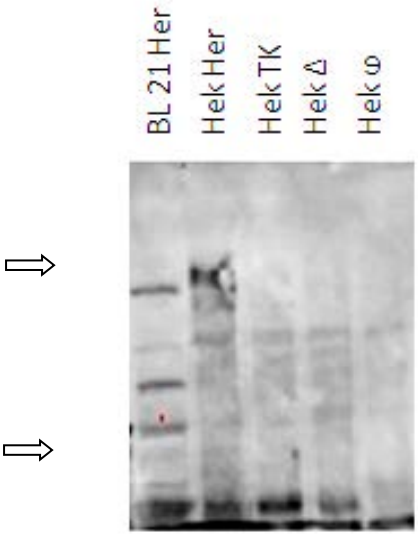
Projet 3 : Ciblage des voies de signalisation mammifère

Antagonisme d'EGFR : Rappelons que l'EGFR est la cible la plus validée en cancer solide. Notre étude d'expression de ce récepteur chez *E.coli* a révélé en plus de la bande attendue de 160kDa, une bande d'environ 30kDa. Nous avons donc décidé de suivre cette protéolyse dans le cas de l'expression de la partie intracellulaire ainsi que sa forme Δ.



Analyse par Western Blot en utilisant l'anticorps anti-EGFR.

D'après ce Western, nous constatons la présence de nos protéines hétérologues TKJM et TKJMΔ exprimées avec leur bonne taille mais avec une autre bande en dessous de ≈ 60kDa qui correspond à notre protéine sans GST et d'une bande de 30kDa.
Nous avons poursuivi le comportement de l'EGFR exprimé dans son endroit d'origine qui est la cellule mammifère. Nous avons donc transfecté la lignée cellulaire normale qui est HEK293 pour savoir s'il y a différence entre ces hôtes.



En comparant l'expression de Her chez BL21 et HEK 293 par western blot nous constatons que l'EGFR est bien exprimé et la même forme de protéolyse est détectée (flèches).
C'est ainsi qu'on détecte une forme d'antagonisme d'EGFR, en effet, le peptide clivé bloquera la signalisation d'EGFR intracellulaire en empêchant la liaison des protéines avec domaine SH2 au récepteur EGFR ou en bloquant l'activité tyrosine kinase.
*Antagonisme de la survie en cancer :*Grâce à la collaboration avec le docteur Siden Top (Institut Parisien de Chimie Moléculaire), nous avons pu obtenir plusieurs molécules de synthèse dont celles qui ont fait l'objet de cette étude. Il s'agit des molécules organiques ayant en commun un noyau benzénique greffant du chrome. La molécule inorganique K2Cr2O7 a été aussi utilisée. Nous avons mené une première étude pour tester l'effet cytotoxique de ces molécules de synthèse sur les lignées cellulaires en culture à savoir HEK (non tumorale) , MCF-7, HeLa, Caco-2 et Hep-2.
Les résultats obtenus par le test MTT sur les 5 lignées ont montré que les 5 produits testés ont un effet cytotoxique. Nous avons pu déterminer l'IC50 pour chaque produit testé dans chaque lignée. L'ensemble de ces résultats est récapitulé dans le tableau suivant :

	Hela	Caco-2	Hep-2	MCF-7	Hek
ST38	**IC50=14.89**	**IC50=128.51**	**IC50=56.61**	**IC50=61.64**	**IC50=325.92**
ST39	**IC50=55.33**	**IC50=21.32**	**IC50=17.36**	**IC50=9.72**	**IC50=101.04**
ST40	**IC50=14.87**	**IC50=19.34**	**IC50=5.79**	**IC50=15.31**	**IC50=25.21**
ST41	**IC50=3.60**	**IC50=203.11**	**IC50=8.62**	**IC50= 58.68**	**IC50=7.87**

Nous avons choisi les produits en fonction de leur influence sur la lignée tumorale et la sensibilité de la lignée non tumorale HEK293. En effet nous remarquons que ST38 et ST41 sont deux bons candidats en inhibant HeLa afin de les essayer en cancer du Col de l'utérus chez la femme. Le chrome inorganique s'est avéré un bon candidat pour l'essayer en cancer colorectal en inhibant Caco-2. D'autres part, ST40 et le chrome inorganique sont aussi des bons candidats à tester en cancer épithélial. Finalement ST39 est un bon candidat à tester en cancer du sein. L'extraction du l'ADN après traitement des différentes lignées par les molécules cytotoxiques a

permis de suivre le profil électrophorétique. Dans la plupart des cas nous obtenons un profil caractéristique du l'apoptose (fragmentation du l'ADN en « échelle »).

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 chez les atteints des maladies inflammatoires 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***:** La validation du premier lot de cinq siRNAs spécifiques de notre cible moleculaire''*SLC26A4*'' a été effectuée in vitro, sur des cellules HeLa et HEK293 afin de tester leurs efficacités sur l'atténuation de l'expression du gène. La culture de ces deux lignées cellulaires a été suivie d'une étape de co-transfection par la construction exprimant la pendrine et un vecteur exprimant l'un des siRNAs. 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 du gène SLC26A4. L'analyse ciblée par RT-PCR a montré une réduction remarquable de l'ARNm du gène sous l'effet de deux siRNAs. Cependant, seules les cellules non transfectées par les siRNAs ont exprimé le gène *SLC26A4*. D'autre part, l'analyse par western blot des extraits protéiques des cellules transfectées par la construction sauvage, a révélé la présence de deux bandes de tailles 85 et 110 kDa 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 (1 et 2).

Nos travaux ont retenu deux conceptions de siRNA dont l'efficacité d'atténuation d'expression du gène SLC26A4 et de la pendrine a été évaluée par RT-PCR et western blot respectivement. Ainsi, ces résultats nous ont amené à planifier des travaux de quantification de l'expression du gène par PCR quantitative et à évaluer l'effet des doses de transfection sur le pouvoir atténuateur de chaque siRNA conçu avant de tester leur pouvoir lorsqu'ils sont nus (appliqués directement ; dissocié d'un vecteur). Les résultats obtenus seront par la suite confirmé sur un modèle de cellules épithéliales de poumons et leurs effets sur la transcription seront évalués par des biopuces à ADN.

Criblage et couplage des nanoparticules pour une meilleur vectorisation, traçabilité et stabilité des oligonucléotides **:** Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor. L'utilisation des nanoparticules dans le cadre plus spécifique de la médecine connaît actuellement de grands progrès. Cependant, l'étude des effets biologiques des nanoparticules sur la santé de l'Homme et l'environnement, s'avère une étape primordiale. Dans ce cadre, nous avons commencé par tester la cytotoxicité de deux nanoparticules choisies pour leur appartenance à la famille des lanthanides, (ce qui leur confère une forte émission de lumière visible ou infra-rouge) : '$LaVO_4$:Eu 5%' et '$CeVO_4$:Eu 5%'. Moyennant le test MTT, nous avons montré une faible toxicité de ces deux nanoparticules, sur les trois lignées cellulaires utilisées (HeLa, MCF7 et Hek293). Dans le même contexte, nous avons appliqué la même technique sur les nanoparticules de type $TbVO_4$, encore choisies parmi la grande panoplie de

nanoparticules dont nous disposons, et ayant été collectée grâce à des relations nouées avec des collaborateurs étrangers. Ces nanoparticules, appartenant à la même famille, ont montré une faible cytotoxicité. En effet, suite à leur application (à des concentrations variées) pendant 24h sur des cellules HeLa en culture, le pourcentage des cellules mortes n'a pas dépassé les 35% (en présence de la concentration 320µg/ml), et la concentration inhibitrice médiane (CI50) n'a pas été atteinte. Nos collaborateurs tunisiens ont, à leur tour synthétisé des particules de la famille des pyrochlores $Y_2Ti_2O_7$ et $Y_2Ti_2O_7$: Eu5%. Suite à des mesures de tailles, seules les premières ont montré des tailles nanométriques. Leur application sur les mêmes cellules en culture, et dans les mêmes conditions, ont encore montré des résultats encourageants. Plus que 90% des cellules restent vivantes quelques soient les concentrations appliquées (allant de 5 à 640µg/ml).
Des tests d'immunofluorescence sont envisagés afin d'identifier précisément la localisation cellulaire du stockage de ces 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

Validation à l'aveugle et amélioration des biopuces bicolores: Durant l'année 2016, nous avons étudié 16 familles moyennant notre biopuce de surdité nord-africaine (NADfchip). Parmi huit atteints de surdités isolées sans mutation 35delG, nous avons détecté chez deux familles les mutations c.139G>T et c.263C>G du gène GJB2. Auparavant, la validation à l'aveugle de notre biopuce NADfchip n'a révélé aucune mutation chez 34 parmi 48 cas index. Cela a été déjà confirmé chez 3 sourds par séquençage d'exomes permettant de détecter de nouvelles mutations dans les gènes COL11A2, DCDC2 et SLC22A4. Moyennant un kit à façon SureSelect, nous avons criblé par séquençage haut débit les exons codants et les régions 5' et 3' UTRs de 180 gènes responsables de surdités chez les 37 familles tunisiennes sans mutations connues en plus d'une famille porteuse de la mutation c.7395+3G>C comme témoins positifs. Ceci a permis d'identifier de nouveaux variants au Nord d'Afrique chez 15 familles. L'analyse de la cosegrégation, de ces variants avec la surdité chez les familles d'étude, a permis de retenir huit mutations comme pathogènes ou probablement pathogènes selon les critères de l'ACMG « American College of Medical Genetics and Génomics ». Par ailleurs, chez 8 familles tunisiennes atteintes du syndrome Usher type I, une forme sévère de surdité syndromique, l'analyse par la biopuce NADf a révélé la mutation c.470+1G>A du gène MYO7A chez une famille. Par la suite, l'analyse de liaison génétique couplée au séquençage Sanger a permis d'identifier 3 nouvelles mutations au niveau des gènes USH1C et PCDH15 chez 3 familles d'étude. Afin d'améliorer d´avantage le rendement de notre NADFchip, nous envisageons d'ajouter sur la biopuce les variations nouvellement identifiées et classées comme pathogéniques ou probablement pathogéniques selon l'ACMG.
Concernant la deuxième biopuce destinée pour le diagnostic de la maladie de Charcot Marie Tooth, vu que le test de validation n'a montré aucune mutation, nous avons optimisé dans notre laboratoire l'analyse par le kit TruSight One pour la recherche de nouveaux variants pathogènes chez trois échantillons. Ce kit d'enrichissement et de séquençage offre une couverture complète de la partie codante de 4,813 gènes connus cliniquement pertinents. En analysant le fichier Miseq VCF (Variant Call Format) aucun variant n'a été détecté. Pour la détection de CNV, nous avons utilisé des outils de R/Bioconductor, tels que cn.MOPS. Un gain du nombre de copies du gène PMP22 a été détecté.

Collecte de données concernant les mutations décrites dans les populations Nord Africaines et Conception d'un kit d'enrichissement pour séquençage haut débit : L'objectif de ce travail est de développer un kit d'enrichissement pour séquençage haut débit des régions mutantes décrites chez des patients Nord Africains. Pour cela, nous avons collecté les données concernant les mutations décrites dans les populations Nord Africaines à partir de la base de données de mutations tunisiennes (www.tdvd.org) ainsi que des publications internationales et des communications personnelles. Ceci nous a permis de regrouper plus que 680 mutations responsables de plus que 160 maladies héréditaires. Toutefois, certaines de ces pathologies sont génétiquement non hétérogènes, rares ou ne présentant pas un intérêt diagnostique ce qui rend leur criblage inapproprié par les technologies haut débit. Parmi les pathologies, nous avons choisi celle à incidence élevée dans la population Nord Africaine, génétiquement hétérogènes d'où la difficulté d'identification de la cause génétique moyennant les méthodes classiques et présentant un intérêt diagnostique (diagnostic prénatal, interruption de la grossesse, intérêt thérapeutique…). De même, nous avons décidé d'inclure non seulement les régions mutantes mais la totalité des régions codantes des gènes responsables des pathologies choisies. Au total, 84 gènes couvrants une région de l'ordre de 368kb ont été sélectionnés. Les sondes, correspondants aux exons codants des gènes d'intérêt et aux régions flanquantes, ont été choisies moyennant le logiciel SureDesign. De plus, les paramètres de sélection des sondes (Density, Masking, Boosting) ont étés choisis de telle sorte qu'ils permettent une bonne couverture des régions d'intérêt et garantissant par la suite une profondeur de lecture élevée. Le paramètre ' Density' est fixé à 5X, ceci veut dire que le logiciel sélectionne des sondes où chaque nucléotide est couvert par 5 sondes dans la région cible. SureDesign offre aussi différents degrés de stringence de masquage des régions répétés du génome. En choisissant l'option 'Moderately stringent', nous avons remarqué que certaines régions cibles seront non couvertes par des sondes et par la suite non séquencés ce qui nous a obliger de diminuer la stringence ('least stringent') pour atteindre une couverture de 100%. En plus afin de favoriser la capture des régions riches en GC, nous avons choisi la performance maximale ('Max Performance'). Il est à noter aussi qu'au cours de notre choix des gènes nous avons tenu compte de la mappabilité pour voir la conséquence de séquencer des éléments répétés. Par exemple, le gène CHEK2, responsable du cancer du sein, a été exclu de la liste des gènes à cribler vu la présence de duplication segmentaire ce qui impacte forcément la mappabilité.

Biomarqueurs génomiques et épigénomiques de la surdité liée à l'âge: Une analyse bioinformatique ciblée pour des régions conservées GC-rich a été menée en utilisant différents algorithmes sous programme R/Bioconductor comme par exemple le package BiSeq. Cette méthode a été explorée pour détecter des régions différemment méthylées (DMRs) entre les patients affectés par la presbyacousie et les témoins pour des gènes spécifiques liés au vieillissement et/ou la surdité. Pour mieux comprendre les voies épigénétiques y impliquées, des interprétations biologiques des DMRs déduites ont été de plus étudiées. Une étape de validation par real-time methylation-specific PCR (MSP) sera envisagée pour quantifier les différences de méthylation déduites dans des sites CpGs spécifiques entre les groupes de malades et témoins. Egalement, nous avons élargi le nombre de transcriptome analysé par puces à ADN à quinze femmes (9 atteintes de surdité liée à l'âge et 6 témoins). Un pepline d'analyse de transcriptomes a été développé avec des outils d'analyse bioinformatique et biostatistique sous le programme R/Bioconductor. L'analyse différentielle d'expression a révélé des changements significatifs dans des profils d'expression avec |Fold Change| > 2 et FDR <0,05, correspondant à 322 gènes sous-exprimés et 31 gènes sur-exprimés comparant les groupes de malades aux témoins. Des sous-

expressions de gènes intéressants comme COL11A2 et OTOA ont été identifiées. Une étape de validation par la PCR en temps réel sera également envisagée pour la validation des différences d'expression déduites pour les gènes les plus intéressants.

Projet 6 : Développement de kits pour l'authenticité moléculaire

Authenticité et traçabilité moléculaire de l'huile d'olive : La première action a pour objectif de développer un kit pour la traçabilité moléculaire des huiles d'olives. Des travaux précédents ont permis d'optimiser le protocole d'extraction d'ADN à partir d'huile vendue en vrac ou commercialisée emballée (filtrée) et de choisir un ensemble de trois marqueurs de type STR. De nouveaux marqueurs de type SNP ont été alors testée et leur pourvoir de discrimination seuls et combinés les uns aux autres et leur capacité à distinguer les huiles extraites de différents cultivars tunisiens ont été évalués. 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 montré 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. 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. En 2016, 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 entamés. Les analyses préliminaires ont révélé des polymorphismes spécifiques à chaque espèce mais aussi des variants ponctuels qui pourraient

être utilisé pour pister les origines géographiques des espèces présentes dans l'aliment. 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. Deux articles résumant l'essentiel de ces travaux ont été préparés et soumis pour publication.

Identification individuelle : Nous nous sommes intéressés au cours de la deuxième année à d'autres marqueurs haplotypiques de la région codante du mitogénome (mtSNPs) afin de résoudre les problèmes associés à l'identification de restes squelettiques anciens, de tissus putréfiés et du lien maternel à partir d'indices biologiques inconnus. D'abord, nous avons sélectionné et conçu les amorces de 18 mtSNPs pour des analyses par PCR à allèle spécifique (AS-PCR). Plusieurs optimisations ont mené à amplifier spécifiquement les mtSNPs en un seul programme réactionnel simple de 1h30min. Nous avons par la suite réussi deux multiplexes de 4 et 6 mtSNPs. Ces plexes ont été analysés par électrophorèse capillaire utilisant des couples bébé/maman afin d'évaluer leurs reproductibilités. Du fait de la complexité de l'interprétation des RFUs et des génotypes à cause de l'hétéroplasmie, nous avons eu recours à une autre technique d'analyse par séquençage haut débit des amplicons du mitogénome. Douze PCRs monoplexes ont été réalisées suivant le programme fixé en AS-PCR. Pour le séquençage haut débit d'amplicons sur le mitogénome, nous avons mis au point un protocole en se basant sur celui recommandé par illumina pour le séquençage de l'ARN16S en métagonomique. L'alignement des séquences obtenues a montré la présence de 12 amplicons soulignant la réussite globale de notre protocole allant de la première PCR au séquençage massif dans les deux sens. Par ailleurs, 85% des bases lues ont montré des valeurs de qualité supérieures à Q30 illustrant la haute qualité de notre librairie. L'analyse des mtSNPs dans différentes scènes de crimes est en cours.

Tableau récapitulatif des activités

Articles	Thèses en cours	Stages étranger	Participations congrès	Mastères soutenus	Thèses soutenues	Conférences organisées
20*	15	2	5	3	1	1

*dont 5 où le laboratoire intervient au titre de collaborateur

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Liste de Publications parues en 2016

1. Kharrat N, Belmabrouk S, Abdelhedi R, Benmarzoug R, Assidi M, Al Qahtani MH, Rebai A. Screening for clusters of charge in human virus proteomes. *BMC Genomics*. 2016;17:758.

2. Triki-Fendri S, Sánchez-Diz P, Rey-González D, Alfadhli S, Ayadi I, Ben Marzoug R, Carracedo Á, Rebai A. Genetic structure of the Kuwaiti population revealed by paternal lineages. *Am J Hum Biol.* 2016; 28(2): 203-12.

3. Ben Ayed R, Ben Hassen H, Ennouri K, Rebai A. Genetic Markers Analyses and Bioinformatic Approaches to Distinguish Between Olive Tree (Oleaeuropaea L.) *Cultivars. Interdiscip Sci.* 2016

4. Ben Ayed R, Ben Hassen H, Ennouri K, Ben Marzoug R, Rebai A. OGDD (Olive Genetic Diversity Database): a microsatellite markers' genotypes database of worldwide olive trees for cultivar identification and virgin olive oil traceability. *Database.* 2016. PMID: 26827236;

5. Chakroun A, Ben Said M, Ennouri A, Achour I, Mnif M, Abid M, Ghorbel A, Marshall JD, Naggert JK, Masmoudi S. Long-term clinical follow-up and molecular testing for diagnosis of the first Tunisian family with Alström syndrome. *Eur J Med Genet*. 2016; 59(9): 444-51.
6. Ben-Rebeh I, Grati M, Bonnet C, Bouassida W, Hadjamor I, Ayadi H, Ghorbel A,Petit C, Masmoudi S. Genetic analysis of Tunisian families with Usher syndrome type 1: toward improving early molecular diagnosis. *Mol Vis*. 2016; 22:827-35.
7. Mzid R, Chibani F, Ayed RB, Hanana M, Breidi J, Kabalan R, El-Hajj S, MachlabH, Rebai A, Chalak L. Genetic diversity in barley landraces (Hordeum vulgare L. subsp. vulgare) originated from Crescent Fertile region as detected by seed storage proteins. *J Genet*. 2016; 95(3): 733-9.
8. Ayadi M, Hanana M, Kharrat N, Merchaoui H, Marzoug RB, Lauvergeat V, Rebaï A, Mzid R. The WRKY Transcription Factor Family in Citrus: Valuable and Useful Candidate Genes for Citrus Breeding. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016 ;180(3): 516-543.
9. Souiden Y, Mallouli H, Meskhi S, Chaabouni Y, Rebai A, Chéour F, Mahdouani K. MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biol Res*. 2016;49:22.
10. Zidi I, Kharrat N, Abdelhedi R, Hassine AB, Laaribi AB, Yahia HB, Abdelmoula NB, Abid L, Rebai A, Rizzo R. Nonclassical human leukocyte antigen (HLA-G, HLA-E, and HLA-F) in coronary artery disease. Hum Immunol. 2016; 77(4):325-9.
11. Ben Halim N, Dorboz I, Kefi R, Kharrat N, Eymard-Pierre E, Nagara M, Romdhane L, Ben Alaya-Bouafif N, Rebai A, Miladi N, Boespflug-Tanguy O, Abdelhak S.Determination of arylsulfataseApseudodeficiency allele and haplotype frequency in the Tunisian population. Neurol Sci. 2016; 37(3): 403-9.
12. Bulbul O, Filoglu G, Zorlu T, Altuncul H, Freire-Aradas A, Söchtig J, Ruiz Y,Klintschar M, Triki-Fendri S, Rebai A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo Á, Schneider PM. Inference of biogeographical ancestry across central regions of Eurasia. *Int J Legal Med*. 2016 130(1):73-9.
13. Chaabane S, Marzouk S, Akrout R, Ben Hamad M, Achour Y, Rebai A, Keskes L,Fourati H, Bahloul Z, Maalej A. 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*. 2016;41(4):385-93.
14. El Arbi M, Jalléli K,Trigui F,Pigeon P,GormenM,Top S Aifa S,Fliss I, Jaouen G, and Hammami R. Efficacity of a novel ferroceny/ diary/ butane citrate compound as a biocide for preventing healthcare-associated infections. *Med. Chem. Commun*, 2016, 7:948.
15. Masmoudi S, Behnam M, Mojarrad M, Feng Y, Duman D, Mawla AM, Nord AS, Blanton SH, Liu XZ, Tekin M. Spectrum of DNA variants for non-syndromic deafness in a large cohort from multiple continents. *Hum Genet*. 2016; 135(8): 953-61.
16. Ben Said M, Grati M, Ishimoto T, Zou B, Chakchouk I, Ma Q, Yao Q, Hammami B, Yan D, Mittal R, Nakamichi N, Ghorbel A, Neng L, Tekin M, Shi XR, Kato Y, Masmoudi S, Lu Z, Hmani M, Liu X. A mutation in SLC22A4 encoding an organic cation transporter expressed in the cochlea strial endothelium causes human recessive non-syndromic hearing loss DFNB60. *Hum Genet*. 2016;135(5):513-24.
17. Kallabi F, Ben Rebeh I, Felhi R, Sellami D, Masmoudi S, Keskes L, Kamoun H. Molecular Analysis of Libyan Families with Allgrove Syndrome: Geographic Expansion of the Ancestral Mutation c.1331+1G>A in North Africa. *Horm Res Paediatr*. 2016; 85(1):18-21.
18. Grati M, Yan D, Raval MH, Walsh T, Ma Q, Chakchouk I, Kannan-Sundhari A, Mittal R, Masmoudi S, Blanton SH, Tekin M, King MC, Yengo CM, Liu XZ. MYO3A .Causes Human Dominant Deafness and Interacts with Protocadherin 15-CD2 Isoform. *Hum Mutat*. 2016; 37(5): 481-7.
19. Chakroun A, Ben Said M, Ennouri A, Achour I, Mnif M, Abid M, GhorbelA,Marshall JD, Naggert JK, Masmoudi S. Long-term clinical follow-up and molecular testing for diagnosis of the first Tunisian family with Alström syndrome. *Eur J Med Genet*. 2016; 59(9): 444-51.
20. Yan D, Tekin D, Bademci G, Foster J 2nd, Cengiz FB, Kannan-Sundhari A, Guo S, Mittal R, Zou B, Grati M, Kabahuma RI, Kameswaran M, Lasisi TJ, Adedeji WA, Lasisi AO, Menendez I, Herrera M,

Carranza C, Maroofian R, Crosby AH, Bensaid M, Masmoudi S, Behnam M, Mojarrad M, Feng Y, Duman D, Mawla AM, Nord AS, Blanton SH, Liu XZ, Tekin M. Spectrum of DNA variants for non-syndromic deafness in a large cohort from multiple continents. *Hum Genet.* 2016; 135(8).

FORMATION DIPLOMANTE

Thèses de doctorat soutenues en 2016

Imen Chakchouk: 'Développement et application des technologies de haut débit pour identification de gènes responsables de maladies héréditaires' soutenue Mai 2016.

Mastères de recherche soutenus en 2016

1. Triki Hana : Etude du profil de méthylation des gènes pour des cibles immunomodulatrices impliquées dans le contrôle du microenvironnement immunitaire dans le cancer du sein.

2. Dhouha Msalbi: Etude comparative des protéines d'EGFR exprimées chez E. coli et HEK293.

3. Imen Gtif: Etude des habitudes alimentaires et des activités antioxydantes chez les patients coronariens.

ORGANISATION DE MANIFESTATIONS SCIENTIFIQUES EN 2016

- Third International Conference on Bayesian Networks and Applications (Octobre 14-16, 2016 Sousse- Tunisia)

FINANCEMENTS :

Sur contrat-programme : 112,500 DT

Coopération internationale (projets en cours ou initiés en 2016):

- Projet TWAS. SLC26A4 gene silencing for a potential siRNA-based therapy of respiratory inflammation. Budget: 12000 $US
- Projet TWAS Assessment of antioxidant status of patients with cardiovascular diseases and relationship with diet. Budget: 3.500 $US
- Projet COMSTECH-TWAS "Novel active biomolecules from foliar endophytic microorganisms selected from the saharan and arid Tunisian flora". Budget: 8000 $US
- Projet dans le cadre de la cooperation tuniso-allemande (TUNGER):' Implementation of zebrafish core facility: towards the characterization of novel human hearing loss genes and screening of therapeutic molecules (Zebrascrin)'
- Projet espagnol I- Coopt (terminé fin 2016)

Projets nationaux

- Projet (VRR) intitulé :'Kits basés sur des technologies haut débit pour l'aide au diagnostic moléculaire de maladies génétiques chez la population Nord -Africaine ; Budget : 120.000 DT

-Projet dans le cadre du programme de recherche fédérés (PRF, 6 partenaires) :'PBMLT : Plateforme Biométrique Multimodale de Prévention contre le Terrorisme', Budget : 400.000 DT

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

وحدة مختصة: تثمين نتائج البحث

Responsable : Mr.Ilem HASSAIRI

Email : ilem.hassairi@cbs.rnrt.tn

Membres de l'Equipe

Mr. Ilem HASSAIRI : Ingénieur général/ Responsable de l'unité

Mr. Adel ZITOUN : Ingénieur en chef

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 global

L'Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR) 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 du savoir depuis le laboratoire vers le secteur industriel et l'accompagnement technologique pour l'exploitation et la création de nouveaux produits.

Objectifs spécifiques

- Prendre en charge des expériences de scale-up, de production, de séparation et de conditionnement à l'échelle pilote pour le développement de divers procédés;
- Développer et Intégrer des bioprocédés et/ou produits innovants pour le tissu socio-économique;
- Contribuer au développement des activités de recherches des différents laboratoires du CBS;
- Assister les chercheurs dans la maîtrise et l'utilisation des différentes technologies,
- Produire à l'échelle pilote des cellules ou des biomolécules actives et autres …..
- Résoudre les contraintes technologiques rencontrées par les industriels dans leurs activités;
- Assurer la valorisation technologique et le transfert des antioxydants dans des produits alimentaires.

Activités de l'unité UVRR

Actuellement, les principales activités de l'Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVRR) sont :

1ère activité : Développement et transfert de nouveaux procédés et bioproduits destinés à l'amélioration des produits issus de figue de barbarie.

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

3ème activité : Assistance et extrapolation à l'échelle pilote des projets de recherche élaborés par les différents laboratoires du CBS.

Activité 1 : *Développement et transfert de nouveaux procédés et bioproduits destinés à l'amélioration des produits issus de figue de barbarie*

Cette activité consiste à développer 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.

En effet, dans le cadre du projet Européen CINEA 'Premier forum R21 de la recherche à l'industrie', l'Unité UVRR a proposé de travailler sur un projet intitulé : '*Développement et transfert de nouveaux bioprocédés et /ou bioproduits aux partenaires socio-économiques*'. Un partenaire industriel tunisiens fait partie au dit projet et va étre mobilisé pour l'application, dans leurs procédés de productions, des produits et/ou procédés à valeurs ajoutées élaborés au sein de l'UVRR.

I.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.m^2 a été obtenu après 70 minutes de filtration. Le flux de filtration a été étudié en fonction de la concentration du 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 à noter qu'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 a amélioré nettement le flux de filtration qui a passé de 25 l/h.m^2 à 38 l/h.m^2 et a réduit le colmatage par les fibres ou/et les matières colloïdales.

En perspectives, la technique de dé-colmatage des membranes par pulsation d'air a été étudiée et la possibilité d'associer la bioconversion enzymatique aux procédés membranaires a été développée. Ainsi, la stabilité et la qualité du produit final a été démontrée.

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

I.2.1. production de polyphénols

Les polyphénols sont des produits largement distribués dans le règne végétal. Ils sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et agroalimentaires.

Les raquettes et écorces de figue de barbarie sont reconnues pour leur richesse en fibres, en polysaccharides et en poly phénols qui peuvent les rendre valorisables. 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 (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.

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. L'analyse des résultats obtenus est récapitulée dans les Tableaux 1 ,2 et 3. 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 à partir des écorces de figue de barbarie varie entre 3,53 mg EAG/g (Ethanol) et 22,39 mg EAG/g (Eau), et d'autre part, la concentration des flavonoïdes varie entre 2,2 mg ER/g (Ethanol) et 4,71mg ER/g (Eau) et ce selon la nature du solvant.

Un taux élevé d'extraction des poly phénols à partir des fleurs de figue de barbarie a été obtenu lors de l'utilisation du solvant Eau/Ethanol (Tableau 2). Cependant, le meilleur taux d'extraction des polyphénols à partir des raquettes est obtenu lors de l'utilisation de l'éthanol. Le taux d'extraction des polyphénols à partir des fleurs de figue de barbarie varie entre 10.26 mg EAG/g (Ethanol) et 26,92 mg EAG/g (Eau/Ethanol) et la concentration des flavonoïdes varient entre 11,66 mg ER/g (Eau) et 20,75mg ER/g (Ethanol) (Tableau 2). Le Rapport (polyphénols /flavonoïde) établi pour les raquettes varie entre 3,48 (Eau/Ethanol) et 6,46 (Eau) (Tableau 3).

Tableau 1 : Effet de la variation de la nature du solvant sur les taux d'extractions des polyphénols et des flavonoïdes à partir des écorces de figue de barbarie

Nature de solvant	Eau	Ethanol	Eau/Ethanol
Concentration des poly phénols (mg/g)	22.39	4.29	18.84
Concentration des flavonoïdes (mg/g)	4.71	2.51	4.02
Rapport (poly phénol/flavonoïde)	4.75	1.7	4.68

Tableau 2 : Effet de la variation de la nature du solvant sur les taux d'extractions des polyphénols et des flavonoïdes à partir des fleurs de figue de barbarie

Nature de solvant	Eau	Ethanol	Eau/Ethanol
Concentration des poly phénols (mg/g)	22.42	10.26	26.92
Concentration des flavonoïdes (mg/g)	11.66	12.39	20.75
Rapport (poly phénol/flavonoïde)	1.92	0.82	1.29

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

Nature de solvant	Eau	Ethanol	Eau/Ethanol
Concentration des poly phénols (mg/g)	25.92	24.26	6.09
Concentration des flavonoïdes (mg/g)	4.01	4.22	1.75
Rapport (poly phénol/flavonoïde)	6.46	5.7	3.48

Dans notre étude, les effets des trois paramètres à savoir : la température, la nature du solvant et le temps, sur le rendement d'extraction des poly phénols et des flavonoïdes sont étudiés par le biais d'un plan composite à trois facteurs et à trois niveaux.

Le domaine expérimental défini lors de notre étude est présenté dans le tableau 4. L'objectif de l'étude d'optimisation est de déterminer les conditions optimales de l'extraction par la mise au point d'une stratégie méthodologique utilisant la technique des plans d'expériences.

Tableau 4 : Domaine expérimental du plan d'expérience relatif à l'extraction des polyphénols à partir d'écorces, des fleurs et des raquettes de figue de barbarie.

Variables	Unité	Centre	Pas de variation
Solvant	%	50	50
Température	°C	37	7
Temps	min	180	120

L'analyse des résultats obtenus à partir des plans d'expériences réalisés pour les trois variétés végétales a montré que les effets de la variation du solvant ainsi que de la température sont très significatifs sur le taux d'extraction des polyphénols. Alors que, l'effet de la variation du temps d'incubation dans le domaine prédéfini n'est pas significatif.

Par ailleurs, en ce qui concerne les statistiques expérimentales des coefficients des termes quadratiques, il est à noter que les deux coefficients relatifs à la variation de la nature du solvant présentent des variations très significatives pour les taux d'extraction des polyphénols ce qui montre le type second degré du modèle établi.

Finalement, concernant les taux d'extraction des polyphénols, il est à noter que les interactions entre tous les facteurs sont non significatives. Par contre, l'interaction relative entre les deux facteurs (nature du solvant et température) a montré un effet significatif sur les taux d'extraction des flavonoïdes.

Les concentrations optimales calculées par les différents modèles établis et validés relatifs à l'extraction des polyphénols traités sont récapitulés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Valeurs optimales des facteurs testés relatifs à l'extraction des polyphénols traité par un mélange eau/éthanol à partir des écorces, des fleurs et des raquettes de figue de barbarie

Variables réels	Unité	Valeurs optimales		
		raquettes	écorces	fleur
Solvant (eau/éthanol)	%	17,04 / 73,94	100/0	0/100
Température	°C	39,04	45	40
temps	h	120	360	80

L’analyse des résultats montre que les valeurs maximales d’extraction des polyphénols obtenus dans les conditions optimales mentionnés dans les deux tableaux 5 sont de l’ordre de 28,9 mg/g, de 24,5 mg/g et de 30,5 mg/g, respectivement pour les fleurs, les écorces et les raquettes de figue de barbarie.

I.2.2. Extraction des polysaccharides

L'extraction des polysaccharides des raquettes en utilisant de l'éthanol 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 des rendements d'extraction faible de l’ordre de 12,86% de la masse de poudre de cladode, de 9,69% de la masse de poudre des fleurs et de 10,67% de la masse de poudre des écorces de figue de barbarie. Néanmoins, selon la littérature, la teneur en mucilage de certaines variétés d'Opuntia sp. est de l’ordre de 18 à 20%. Les essais de purification et d’identification sont en cours de réalisation.

I.3. Développement d’un procédé d’extraction des huiles de pépins de figue de barbarie

Un procédé d’extraction basé essentiellement sur les enzymes est mis au point pour extraire la fraction lipidique de pépins de figue de barbarie. L’extraction enzymatique est une méthode que nous avons opté, parmi d'autres, qui permet d’extraire des huiles à partir des pépins de figue de barbarie. Elle consiste à soumette la substance végétale en solution aqueuses en contact avec une solution enzymatique dans un réacteur sous agitation contrôlée. Pour ce faire, les enzymes pré-sélectionnées sont criblées dans un premier temps, en fonction de leur pouvoir à extraire la fraction d’intérêt. Par la suite, on a procédé à l’utilisation de ces enzymes seules puis combinées afin de pouvoir augmenter leurs affinités au substrat.

L’efficacité du choix des enzymes est évaluée en fonction de la détermination du taux des huiles extraits par rapport au taux initiaux actuellement extraits des pépins secs et en fonction de la qualité du produit. En général, les paramètres répertoriés qui influent sur le rendement de l’extraction de l’huiles sont : le temps, la température, le rapport de matières végétales/enzymes, le rapport de matières végétales/eau.

Dans ce projet, les effets des trois paramètres à savoir, la température, le rapport de matières végétales/enzymes et le temps d’incubation sur le taux d’extraction des huiles de pépins sont étudiés à partir d’un plan composite à trois facteurs et trois niveaux aboutissant à un modèle polynomial du second degré. A l’ensemble de tous les points du domaine d’étude, un modèle empirique de second degré est établi. L’objectif principal de ce travail est le criblage des enzymes montrant grande capacité au produit d’intérêt et l’optimisation des paramètres qui influent sur l’extraction enzymatique des huiles de pépins en étudiant les interactions entre les différents facteurs à l’aide du logiciel NemrodW. L’extraction enzymatique a été conduite par utilisation de trois enzymes à savoir cellulyve Lyven [CL], celllalases CBS [CCBS] et Xylanase CBS [XCBS] sur deux lots secs de graines du figuier de barbarie (Opuntia ficus indica) d'origine tunisienne caractérisées par une teneur en matière grasses équivalente de l’ordre de 6,5%. L’analyse des résultats obtenus récapitulés dans le Tableau 7, montre que le pourcentage d’extraction des huiles varie entre 4,7 et 5,9 %, selon le type d’enzyme utilisée.

En effet, l´enzyme Xylanase CBS [XCBS] donne la meilleure valeur d’extraction (90 %). La cellulye Lyven et la cellulase CBS donnent des valeurs inférieures du taux d’extraction d’huile,

soient 78,5 % et 72,3%, respectivement, pour la même activité (24u/ml). Par ailleurs, l'utilisation de concentrations d'enzymes supérieures à 36 UI/ml n'a pas montré une amélioration significative. Cependant, nous avons constaté que le taux d'extraction dépend étroitement de la concentration d'enzyme et ceci pour les trois enzymes testées.

Tableau 7 : Effet de la variation de la nature des enzymes seules ou combinées sur le taux d'extractions des matières grasses des pépins de figue de barbarie

Nature d'enzyme	Température d'extraction (°C)	Taux en MG (%)	Taux d'extraction (%)
Xylanases	50	5.9	90.7
Cellulyves	50	4.7	72.3
Cellulases	50	5.1	78.5
Xylanases+Cellulyves	50	5.9	90.7
Xylanses+Cellulases	50	5.9	90.7

Il est à signaler que le pourcentage maximal du degré d'extraction dépend non seulement de la nature et de l'activité de l'enzyme mais aussi des conditions opératoires. Selon la nature de l'enzyme testée, le rendement d'extraction des huiles dépend étroitement de la température. Un excellent rendement est atteint rapidement à 50°C (au bout de 6 heures). Par ailleurs, le rendement obtenu à 40 °C après 6 heures d'incubation n'a pas dépassé 50,5 %. L'extraction à 50°C est très efficace pour solubiliser les huiles en une durée de 6 heures seulement. Il est très important de mentionner qu´il y a une synergie entre les actions des activités enzymatiques et la température pour l'extraction des huiles du pépin de figue de barbarie. Les concentrations initiales des pépins en matières sèches affectent clairement le rendement en huiles. De ces résultats, on remarque que le meilleur rendement (environ 90 %) est obtenu pour un extrait sec des pépins de 5 %. L'utilisation de concentrations élevées n´améliore pas le rendement d'extraction des huiles. Cela s'explique par la saturation des sites d'extraction, vu l'état rhéologique des substrats pour l'activité enzymatique. La matière grasse extraite de ces pépins par extraction enzymatique se présente sous forme de liquides visqueux de couleur jaunâtre. Les différents extraits ont montré une composition chimique variée et différente selon la nature de l'enzyme d'extraction utilisée. Le tableau 8 présente la composition chimique des extraits en matières grasses des graines du figuier de barbarie en fonction de la nature de l'enzyme d'extraction utilisée. Les composés sont énumérés selon leur temps de rétention (TR).

Tableau 8 : Composition chimique des extraits en matières grasses des graines du figuier de barbarie

Composés		TR	Extrait Xylanase	Extrait Cellulyve
Acide myeristique	(%)	8.06	-	14.23
Acide palmitoloique	(%)	11.7	2.05	-
Acide palmitique	(%)	11.9	22.4	18.08
Acide linoléique	(%)	19.28	4.79	-
Acide oleique	(%)	19.6	49.23	45.04
Acide stéarique	(%)	11.06	6.11	17.85

Cinq constituants ont été identifiés dans l'extrait aux xylanases représentant 4,8 % du concentré avec en majorité l'acide oléique (49,23%), l'acide palmitique (22,47%), l'acide stéarique (6,11%), acide linooléique (4,79%) et l'acide palmitique (2,05%). Quatre constituants ont été identifiés dans l'extrait au cellulyve qui a représenté 3,7% du concentré. Par ailleurs, il est à noter que les cinq extraits sont caractérisés par une richesse en acides oléique jusqu'à 50 %.

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. Les recherches menées au sein du Laboratoire LBPE portent sur la production des antioxydants à partir des feuilles d'olives et autres et avancent considérablement. Certains d'entre eux sont transférés à l'UVRR pour une extrapolation des résultats à une grande échelle. 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 projet vise à valoriser l'utilisation de certains extraits de plantes à partir des feuilles d'olives et des dérivés de figue de barbarie.

Le procédé d'extraction des antioxydants à partir de plantes végétales nécessite des étapes d'extraction, de concentration et de purification. Ce procédé a nécessité l'optimisation des étapes d'extraction dans des réacteurs de volumes croissants, de séparation par l'application de la technologie membranaire et de concentration sous vide par rotavap. Toutes les opérations unitaires sont bien étudiées à l'heure actuelle à l'échelle Pilote. La production des quantités considérables ainsi que la formulation des antioxydants ont été réalisées en étroite collaboration avec le laboratoire LBPE. Les antioxydants produits à grandes échelle sont 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 des produits riches en graisses et lipides. L'utilisation des antioxydants naturels a pour objectif de retarder les réactions d'oxydation, d'empêcher les contaminations par des bactéries et de retarder le vieillissement des produits.

La société NOPAL, en tant que deuxième partenaire au projet est également intéressée par l'utilisation de ces Biomolécules actives élaborées au CBS dans la gamme de ces produits, essentiellement les huiles. Cette valorisation s'est réalisée grâce à l'incorporation de ces

substances, sous forme d'extraits de distillats, dans les produits alimentaires afin de diminuer leur oxydation en condition de chauffage. Les résultats de cette étude restent confidentiels.

Activité 3 : *Développement et extrapolation des résultats de la recherche*

Les principaux projets de recherche développés au sein de l'UVRR durant l'année 2016 sont les suivants :

1. 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.

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

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 développement est présenté.

1. 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.

A 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. 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. 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.1.1. Clarification-délipidation du lactosérum

Le lactosérum est un coproduit de l'industrie laitière. Il contient environ 50 % des nutriments du lait (protéines solubles, lactose, vitamines et minéraux). L'exploitation de ce coproduit 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.).

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. 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. Ainsi, les bilans massiques établis montrent que les fractions de protéines retenues par les membranes de MF sont faibles et ne dépassent pas les 7 %. Par ailleurs, nous avons pu constater qu'en termes de rendement de délipidation, 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%.

I.1.2. Extrapolation de la production en batch à l'échelle fermenteur de capacité 7 et 20 L

I.1.2.1. Effet de la concentration du lactosérum sur la production des cellules recombinantes d'*E.coli* PAD33 exprimant les deux activités enzymatiques GI et L-AI

Afin d'affiner les résultats préliminaire obtenus de l'optimisation 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 de 700 trs/min et une aération de l'ordre de 1vvm.

A la lumière des résultats obtenus (Tableau 1), nous remarquons que 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 passe d'une valeur de 0,98 à une valeur de 0,93g/L/h. Cependant 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). Pour la production des cellules *d'E.coli* en utilisant le lactosérum, on a montré que l'ajout dans le milieu de culture d'une source d'azote complémentaire (essentiellement l'extrait de levures) est nécessaire pour l'augmentation de l'activité spécifique chez la souche testée.

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

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.

I.1.2.2. 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'O_2 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 productivités et les meilleurs rendements de production de cellules *d'E.Coli* sont obtenues 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.1.2.3. 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 uniquement de l'ordre de 7,9 g/L.h. 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 ont 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 en batch alimenté 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 beaucoup plus grands comparativement au mode de fermentation en batch.

I.1.2.4. 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.

I.2. Extrapolation d'un procédé de fabrication de sirop de Fructo-Tagatose à partir de lactosérum.

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. La glucose isomérase (GI) et la L-arabinose isomérase (L-AI) sont des enzymes utilisées dans la bioconversion du fructose et du D-tagatose, respectivement. Le procédé de fabrication d'un sirop de D-fructo-tagatose à partir du lactosérum nécessite des étapes de purification du lactosérum et de bioconversion du lactose..

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 lactosérum nécessite des étapes d'élimination non seulement des lipides et des protéines mais aussi des minéraux qui peuvent gêner la phase de bioconversion par les cellules *d'E.coli* en Fructo-Tagatose. Le but de ce travail consiste à la mise au point d'un procédé fiable et reproductible de purification du lactosérum.

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, criblées auparavant au labo LMBIE, ont été testées à grande échelle. L'échange d'ion qui constitue la troisième étape du procédé est menée en lits séparés dans des colonnes en verre de hauteur 1,20 m et de diamètre intérieur de 4 cm, le produit délipidé et déprotéiné est envoyé sur une résine cationique forte C 26A en cycle H, puis sur une résine anionique faible A 368 en cycle OH. Ensuite, 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 95 %.

Par ailleurs, la concentration du lactose dans la solution du lactosérum traité reste constante. Il est à noter que le meilleur taux de déminéralisation est obtenu à une température de 30°C sous un débit d'alimentation des deux colonnes de l'ordre de 1,98 L/h. L'augmentation de la température au-delà de 30°C et l'augmentation du débit d'alimentation au-delà de 1,98L/h affectent négativement le taux de déminéralisation. À une température de l'ordre de 50°C, le taux de déminéralisation est de l'ordre de 72 %. L'élévation de la température au-delà de 30°C augmente la conductivité résiduaire car les ions seront plus mobiles, donc il sera mieux de travailler à une

faible température et à un faible débit afin d'obtenir une déminéralisation presque totale des sels contenues dans le produit.

La composition en éléments minéraux du lactosérum a été caractérisée par chromatographie ionique. Les résultats, présentés dans le tableau 2, montrent que, dans des conditions bien définis, le rendement de déminéralisation est de l'ordre de 95%.

Tableau 2 : Composition en éléments minéraux du lactosérum avant et après déminéralisation

	Avant déminéralisation	Déminéralisation des cations	Déminéralisation des anions
Calcium (mg/l)	74	11	6
Phosphore (mg/l)	791	577	17
Chlorures (mg/l)	1735	1077	4,2
Sodium (mg/l)	362	49,2	36 ,2
Magnésium (mg/l)	232	50	13,8
Potassium (mg/l)	1126	49,1	43
Rendement	_	57	95

Nous constatons ainsi que les concentrations en calcium et en phosphores passent de 74 mg/L et 791mg/L à 0,2 et 10 mg/L, respectivement. De même, la concentration en chlorures se réduit à 43mg/L avec un rendement d'élimination de l'ordre 96,2%.

Donc on peut conclure que les ions alcalins que les ions alcalino-terreux sont éliminés, de même que les chlorures notamment.

L'application de la technologie membranaire couplée à l'échangeuses d'ions nous a permis de purifier le lactose du lactosérum avec un taux de purification de l'ordre de 95%. Il est à signaler, que la purification du lactose du lactosérum à un degré élevé supérieur à 90% était l'un de nos objectifs et ceci pour la mise en place d'un procédé de fabrication d'un sirop des édulcorants à partir du lactose du lactosérum.

II. Prestation de services

II.1. Prestation de services assurés pour les différentes structures de recherche du CBS

L'Unité de Valorisation des Résultats de la recherche assure également une assistance aux différents laboratoires du CBS 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 micro-organismes,
- 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,
- Exécution 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 15 fermentations en batch et en batch alimenté dans des fermenteurs de volumes croissants de 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 biotechnologie moléculaire des eucaryotes du CBS (LBME).

2. Réalisation de 20 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.

3. Exécution de 7 fermentations pour la production de biomolécules à activité anti-fongique ou anti-bactérienne dans des fermenteurs de capacité totale 5 L et 20 L. Cette production a été réalisée pour le compte du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS (tableau 4).

4. Réalisation de 3 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 (LBMIE) (tableau 1).

5. Réalisation de 4 fermentations pour la production des enzymes (-glu) dans des fermenteurs de capacité 20L. Ces fermentations ont été réalisées pour le compte du Laboratoire des bioprocédés environnementaux du CBS (tableau 1)

6. Exécution de 3 fermentations pour la production des Biomolécules actives dans des fermenteurs de capacité 7 L. Ces fermentations ont été réalisées pour le compte du Laboratoire LMB environnementaux du CBS (tableau 1)

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 (tableau 2).

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 (tableau 2).

9. Séchage par lyophilisation des solutions protéiques, enzymatiques et de micro-organismes. Cette opération a été réalisée pour le compte du Laboratoire de biotechnologie moléculaire des eucaryotes, 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 du 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.

Tableau 1 : Nombre total de fermentation, volumes totaux préparés et la durée total d'incubation, réalisées au cours de l'année 2016 pour le compte des laboratoires du CBS

Laboratoire	Nombre de jours d'incubation	Volume total (L)	Nombre de fermentation
LBMIE	09	120	03
LBPE	61	32	04
LMB	54	47.5	07
LBpest	52	572.5	20
LBME	122	244	15
LPCMC	03	08	02

Tableau 2 : Prestations de services : séparation, concentration, séchage et analyses spectroscopiques et autres, réalisées au cours de l'année 2016 pour le compte des laboratoires du CBS

Laboratoire	Séparation/concentration	Broyage/ séchage	Analyses
LBMIE	03	08	09
LBPE	03	04	04
LMB	-	04	11
LB.pest	01	10	04
LBME	-	05	01
LPCMC	-	01	01
LBAP	01	03	04

Par ailleurs, l'UVRR a réussi à mettre en place des programmes spécifiques de scale-up multiples. Des coopérations avec les organismes nationaux et autres et des conventions avec le monde socio-économique ayant pour objectifs la prestation de services, l'application et le transfert des résultats de la recherche et/ou de la valorisation.

II.2. Prestations de services pour les différentes autres structures de recherche et le monde socio-économique

L'Unité de Valorisation des Résultats de la recherche assure également une assistance aux autres établissements et au monde socio-économique en Tunisie dans la réalisation d'analyses et des opérations unitaires dont l'unité dispose. Citons par exemple :

- Séchage par lyophilisation ;
- Concentration par Rotvap ;
- Dosage d'azote total par la méthode Kjeldalh,
- Dosage des enzymes et autres.

Les principales prestations de service réalisées, dans le cadre de cette thématique, pour le compte des organismes nationaux à savoir l'ENIS et le monde socio-économique à savoir AGROMED sont les suivants :

- Réalisation de 3 lyophilisations des solutions enzymatiques et des produits végétales pour le compte de l'unité enzyme et bioconversion de l'ENIS.
- Analyses physico-chimiques et microbiologique à savoir la détermination des matières minérales et azotés, le dosage et la détection d'enzymes, le dénombrement des germes totaux et les psychrophiles etc. pour le compte de la société AGROMED.

Service d'Analyse

Responsable : Pr.Hafeth Belghith

Email : hafeth.belghith@cbs.rnrt.tn

Le personnel du Service Analyse:

- Pr. HafedhBelghith : Responsable
- Mme : NajlaMasmoudi : Ingénieur Principal
- Mme : Fatma Rezgui : Ingénieur Principal
- Mlle : Lobna Jlaiel : Technicienne Principal
- Mme : Hajer hassairi : Technicienne
- Mr : Walha Kamel : Technicien Principal
- 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 2016

Des analyses effectuées par les chercheurs des différents laboratoires

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

	GC/MS	FPLC	HPLC Agilent 1200 1100	HPLC préparative
LBPE	**35**			
LBME	**36**	**65**	**4+20**	**94**
LBPest	**23**	**10**	**13**	
LMB	**1**		**8**	
LBMIE	**10**	**126**	**68**	**25**
LPCMC	**12**		**25**	
LBAP		**2**	**26+16**	
UVRR	**3**			
Externes	**11**			
Total	**131**	**203**	**180**	**119**

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.

Analyse 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).

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 Rebai	**503**	**460**
LMB MELLOULI	**2**	**2**
LBMIE Bejar	**84**	**65**
LBAP BRINI	**198**	**160**
LBPE sayadi	**53**	**19**
LBPESTI Tounsi	**114**	**91**
LB ME Gargouri	**585**	**422**
TOTAL	**1539**	**1219**

Tableau 2: analyses effectués par le Service de Séquençage

Nous pouvons faire le séquençage de presque tous les types d'ADN: plasmides, cosmides, phages et amplicons (PCR). Nous pouvons utiliser des amorces universelles ou des amorces spécifiques. Nous sommes en mesure d'effectuer des lectures de 600 à 800 pb par migration.

Depuis 2014 le Service d'Analyse du CBS est en cour d'evolution à une Plate-forme d'Analyse Génomique (PAG) qui offre un service de séquençage nouvelle génération sur la plateforme d'un nouveau séquenceur haut débit de la gamme Illumina : le séquenceur MiSeqV2Ce séquenceur haut débit. Les lectures peuvent aller jusqu'à 250 nucléotides en single-read ou paired-end, soit un maximum de 7,5 Gigabases lues.

Il peut répondre à des besoins variés comme le reséquençage, séquençage de novo, séquençage ciblé (exome, amplicon, métagenome16S, SmallRNA).

Les applications couvertes par ce service sont : Séquençage de génomes (bactériens et eucaryotes), Séquençage d'ADN complémentaires/transcriptomes/expression, Épigénétique, immunoprécipitation de chromatine, méthylation, Détection de variations alléliques/somatiques, Capture de séquences ciblées, Plastides, mitochondrie, virus, BACs, plasmides, Métagénomique et diversité.

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

Les travaux effectués sont résumés dans le tableau3

Séquençage d'ADN Génomique	Bactérie	Champignon	16 S	Exomes	Fosmides
LMB(Mr.SamirBejar)	**5**	**-**	**29**	**-**	14
LMB (Mr. Saber Masmoudi)		**-**	**-**	**3**	
LMBE (Mr. Ali Gargouri)		**1**	**-**	**-**	
LBPE	**-**	**-**	**132**		

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.