**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

# RAPPORT D'ACTIVITES

# DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX

# ANNEE 2017

**RA / CBS. 2017**

# TABLE DES MATIERES


1- Message du Directeur Général 2

2- Présentation générale du CBS 4

3- Effectif du CBS 6

4- Liste des Enseignants Chercheurs / Ingénieurs du CBS 6

5- Membres du Conseil Scientifique 7

6- Budget du CBS 8

7- Equipement lourd du CBS 9

8- Service maintenance 10

9- Coopération Internationale 11

10- Ouverture sur l'environnement 11

11- Production Scientifique 15

12- Journées scientifiques 15

13- Prix et distinctions 16

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

- LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) 17
- LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME) 32
- LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB) 50
- LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes (LBAP) 61
- LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB) 76
- LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) 89
- LR15CBS07 : Laboratoire de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire (LPCMC) 101
- US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches (UVRR) 116
- Service Analyse 129

**Message du Directeur Général**

L'année 2017 a été particulièrement intense et enrichissante pour le CBS. L'institution a une structure managériale solide, un processus transparent d'implémentation de ses activités de recherche et de valorisation et un bon cheminement interactionnel avec le secteur de la Biotechnologie. Le CBS a décroché sa certification AFAQ AFNOR INTERNATIONAL ISO 9001 : 2015 le 9 Mai 2017. Le CBS reste unique parmi toutes les institutions nationales de R et D en poursuivant des recherches scientifiques avancées dans ses 7 laboratoires assurant une production scientifique en nette évolution (137 Publications en 2017 soit un taux supérieur à 2,7 publications/chercheur/an et 13 Brevets nationaux), tout en contribuant à l'enseignement supérieur et à l'encadrement des jeunes scientifiques (24 Doctorats et Habilitations Universitaires et 22 Mastères ont été soutenus durant 2017). L'année 2017 a été excellente, en termes de succès dans les programmes nationaux et internationaux de recherche et de formation. Plusieurs projets de recherche scientifiques nationaux (coordination de 3 projets PRF, 4 projets jeunes chercheurs, 2 projets PAQ COLLABORA et PAQ PFE) et internationaux (H2020, USAID, COST, ARIMNET, ERANET-Med). Le CBS a récolté les 3 meilleurs prix nationaux de la recherche en Tunisie dont le Prix Présidentiel du meilleur chercheur 2017, le Prix Présidentiel de la meilleure thèse de doctorat 2017 ainsi que le prix de la meilleure Femme chercheur 2017 (Ministère de la Femme) en plus du 2ème prix du meilleur projet de valorisation et de transfert (JNVR 2017) obtenu par la Start-up Astrum Biotech. Le CBS incite ses chercheurs et ingénieurs à mieux valoriser leurs travaux de recherche, essai de créer son écosystème de TT et dynamiser sa pépinière d'entreprises. C'est dans ce sens que le CBS a signé en 2017, 4 nouvelles conventions avec des entreprises économiques dont celle finalisée avec la société MEDIS pour développer et commercialiser les produits biopesticides du CBS à l'échelle national et régional. L'année 2017 a vu l'hébergement dans l'incubateur CBS de 4 start-up pilotés par des jeunes chercheurs.

Le CBS est fier d'être à la pointe des applications biotechnologiques. Développement de biopesticides, enzymes et biomolécules/biomatériaux innovants, développement de kits de diagnostic, production de plantes résistances au défi du changement climatique et de la génération d'énergie provenant de sources renouvelables ne sont que quelques exemples de la contribution des activités du CBS aux objectifs du développement durable mondial.

*Sami Sayadi*

*Mai 2018*

# Certificat

*Certificate*

**N°2017/75201.1**

**AFAQ AFNOR INTERNATIONAL certifie que le système de management mis en place par :**
*AFAQ AFNOR INTERNATIONAL certifies that the management system implemented by:*

## CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX
## CBS

**pour les activités suivantes :**
*for the following activities:*

- **ACTIVITES DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT EN BIOTECHNOLOGIE.**
- **ACTIVITES DE VALORISATION DES RESULTATS DE LA RECHERCHE ET DE TRANSFERT DE TECHNOLOGIE.**

- **RESEARCH AND DEVELOPMENT ACTIVITIES IN BIOTECHNOLOGY.**
- **ACTIVITIES FOR VALORIZATION OF RESEARCH RESULTS AND TECHNOLOGY TRANSFER.**

**a été évalué et jugé conforme aux exigences requises par :**
*has been assessed and found to meet the requirements of:*

## ISO 9001 : 2015

**et est déployé sur les sites suivants :**
*and is developed on the following locations:*

**Route Sidi Mansour Km 6 BP 1177 3018 SFAX TUNISIE**

Ce certificat est valable à compter du (année/mois/jour) *This certificate is valid from (year/month/day)* **2017-05-09** Jusqu'au *until* **2020-05-08**

**Administrateur d'AFAQ AFNOR INTERNATIONAL**
*Administrator of AFAQ AFNOR INTERNATIONAL*

**M. AUGEREAU-LANDAIS**

*Flashez ce QR Code pour vérifier la validité du certificat*

Seul le certificat électronique consultable sur www.afnor.org, fait foi en temps réel de la certification de l'organisme
The electronic certificate only, available at www.afnor.org, attests in real-time that the company is certified
Accréditation TUNAC n° 3-0003, Certification de Systèmes de Management. TUNAC accreditation n° 3-0003, Management Systems Certification
GERTI n°7 F 0085.3 MU 03/2016 AFAQ est une marque déposée AFAQ is a registered trademark

AFAQ AFNOR INTERNATIONAL S.A. – Immeuble Luxor, Centre Urbain Nord, Avenue Hédi Karray – 1082 Tunis – Tunisie
T. (216) 71 751 533 – F. (216) 71 767 561 – R.C. : B199831997 – www.afnor.org

# 1) 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'Entreprises 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 2017:

### Le projet qualité au CBS

Le projet qualité au CBS, entamé en 2016, a été poursuivi par l'attribution à un consultant en management de la qualité la mission d'assistance à l'implémentation du SMQ et notamment la veille au bon déroulement des différentes étapes du projet, soit :
**Etape 1** : Diagnostic et élaboration d'une stratégie et d'un plan d'action
**Etape 2** : Sensibilisation/Formation du personnel entrant dans le périmètre de la certification et validation de la documentation SMQ
**Etape 3** : Mise en place et contrôle du système SMQ, audits internes et suivi des actions correctives et du plan d'action
**Etape 4** : Revue de la direction et audit de certification.

A cet effet, une cellule qualité, composée de Mr Fathi Aloui (RMQ) et Mme Hekma Ayadi (GDOC), a été créé afin de renforcer les efforts déployés à la mise en place du SMQ et notamment l'accompagnement des pilotes des processus à la mise en œuvre du système documentaire et à la diffusion de la culture qualité auprès du personnel du centre.
Par ailleurs, 9 auditeurs internes ont réussi l'examen de qualification après avoir suivi une formation portant sur les normes ISO9001-2015 et ISO19011. Leur rôle est d'assurer le suivi et l'entretien du SMQ ainsi qu'à la contribution à son amélioration continue.

Depuis le 9 mai 2017, **le CBS est certifié ISO 9001 :2015** par l'organisme **AFAQ- AFNOR INTERNATIONAL dans le domaine :**

- Activités de Recherche et Développement en Biotechnologie
- Activités de Valorisation des Résultats de la Recherche et Transfert de Technologie

### Hébergement de 4 Start-ups au CBS

Durant 2017, un premier appel à projets a été lancé par le CBS pour l'hébergement de startups dans la pépinière d'entreprises pour inciter les porteurs d'idées innovantes à potentiel valorisable à déposer un dossier de candidature

Ces idées ont été présentées en date du 19 juillet 2017 lors de la réunion du conseil scientifique composé des membres du CS du CBS et de professionnels en relation avec le monde de création d'entreprises en présence de :

- Mme Samia Charfi Kaddour, directrice générale de la valorisation de la recherche au MESRS.

- Mr Mohamed Belhaj, Directeur du Centre de développement de Carrière à l'Université de Sfax.

- Mr Sami Zayani, Expert-comptable et Expert en création d'entreprises.

Les projets ont étés sélectionnés selon :

- Le caractère innovant de la technologie ;
- Le degré de maturité des projets ;
- La faisabilité économique et financière du projet ;
- L'état de la propriété intellectuelle (liberté d'exploitation) ;

A cet effet **4** projets ont été retenus : **BiotechEcozym** ; **Pharma Plant** ; **Phyto care** et **Astrum Biotech** qui est une startup déjà créée.

Les porteurs de projets signeront un contrat d'hébergement avec le centre.

A ce jour l'appel à projet est ouvert et les dossiers de candidature devraient être déposés au bureau d'ordre du CBS.

Ce rapport d'activités se rapporte aux activités des différentes structures de recherche du CBS durant l'année 2017 (la 3ème 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 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 |
| LBPLR15CBS04 : 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 |

## 2) Effectif du CBS :

| Année | 2017 |
|---|---|
| Enseignants Chercheurs | 49 |
| Corps Technique | 55 |
| Administratifs + ouvriers | 40 |
| **Effectif Total** | **144** |

## 3) Liste des Enseignants Chercheurs et Ingénieurs du CBS

| Nom et Prénom | Position |
|---|---|
| | |
| Sami Sayadi | Professeur / Directeur Général du CBS / Directeur d'un laboratoire |
| Samir Bejar | Professeur / Directeur d'un laboratoire |
| Ali Faouzi Gargouri | Professeur / Directeur d'un laboratoire |
| Raja Mokdad | Professeur |
| Ahmed Rebaï | Professeur / Directeur d'un laboratoire |
| Abdelhafidh Dhouib | Professeur |
| Lotfi Mellouli | Professeur / Directeur d'un laboratoire |
| Slim Tounsi | Professeur / Directeur d'un laboratoire |
| Sabeur Masmoudi | Professeur |
| Mohamed Sami Aïfa | Professeur |
| Mohamed Chamkha | Professeur |
| Hichem Chouayakh | Professeur |
| Souad Rouis | Professeur |
| 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 de conférences |
| Sonia Khoufi | Maître de conférences |
| Walid Saïbi | Maître de conférences |
| Fatma Karray | Maître Assistant |
| Rayda Zribi | Maître Assistant |
| Héla Trigui | 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 |
| 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 |
| Dorra Abdelmalek | Maître Assistante |
| Mohamed Ali Mesrati | Maître Assistant |
| Ikram Zaidi | Maître Assistante |
| Slim Smaoui | Maître Assistante |
| Firas Feki | Ingénieur Général |
| Ilem Hassaïri | Ingénieur Général / Directeur Unité Spécialisée |
| Fathi Aloui | Ingénieur Général |
| Ines karray | Ingénieur en chef |
| Adel Zitoun | Ingénieur en chef |
| Mohamed Ali Masmoudi | Ingénieur en chef |
| Najla Fourati | Ingénieur Principal |
| Najoua Ayadi | Ingénieur Principal |
| Bochra Mellouli | Ingénieur principal |
| Fatma Rezgui | Ingénieur Principal |
| Riadh Ben Marzouk | 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

### 4) Membres du Conseil Scientifique du CBS

- 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 (D Central GCT)
- Lassad Boujbal (DG MEDIS)
- Hechmi Louzir (DG Institut Pasteur)
- Zied Borji (DG CTAB)
- Abdelmajid Hamouda (DG ANGED)

## 5) Budget du CBS :

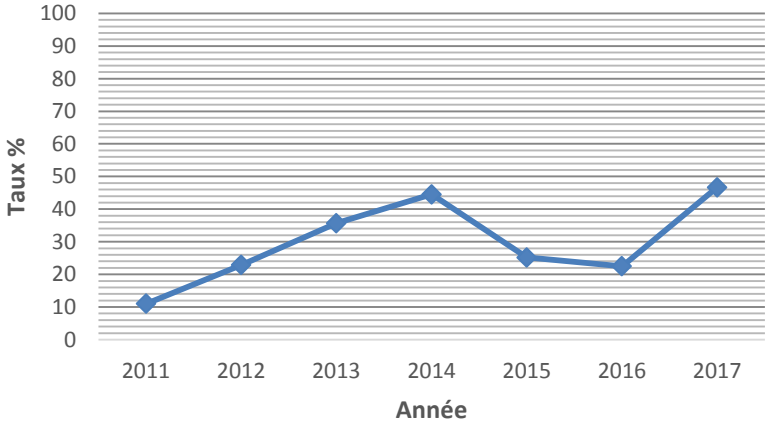
| | |
|---|---|
| **Budget Provenant du Ministère en DT** | **Titre I: 553.000,000** |
| | **Titre II: 800.000,000**<br>**Titre II: 50.700,000** |
| | **Equipement scientifique: 80.000,000** |
| | **Equipement Informatique:20.000,000** |
| | **Entretien Bâtiment : 50.000,000** |
| **Secteur Economique** | **81.381,400** |
| **Coopération Internationale:**<br><br>**1/Projets Multilatéraux (*)**<br><br>**2/Organismes internationaux (**) :**<br><br>**3/ Projets bilatéraux (***)** | <br><br>**243.796,940**<br><br>**194.247,732**<br><br>**112.466,800** |
| **Coopération Internationale (Total)** | **550.511,472** |
| **Total ressources propres (secteur économique et coopération internationale)** | **631.892,872** |

(*) Deux projets européens H2020- MSCA-RISE ; EXANDAS et IPM-4-CITRUS; Un projet Arimnet 2 STomP dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed et et deux projets BIOSMAN et BIOGASMENA de la coopération Tuniso-Euroméditéranéenne « ERANETMED »

(**)The World Academy for Sciences TWAS (2 projets) et the International Foundation for Sciences IFS (1projet ) et 1 projet PEER USAID

(***) 4 Projets PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française ; 3 projets dans le cadre de la coopération Tuniso-Allemande ; 2 projets CMPTM dans le cadre de la coopération Tuniso-Marocaine et 1 Projet dans le cadre de la coopération Tuniso- Sud-Africaine ; 2 projets dans le cadre de la coopération Tuniso-indienne , 1 projet dans le cadre de la coopération tuniso-Belge et 1 un projet LMI COSYS-Med sous tutelle de l'IRD .

Fig 1.Evolution du taux de Ressources propres / budget provenant du Ministère




## 6) Equipements Lourds du CBS

| Désignation | Date d'acquisition | Lieu d'Affectation | Etat |
|---|---|---|---|
| Cytométre en Flux | 2017 | Service d'analyse | Fonctionnel |
| Chaudière à vapeur | 2013 | Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche | Fonctionnel |
| système de Séquencage HD | 2013 | Service d'analyse | Fonctionnel |
| HPLC | 2011 | LBPE | Fonctionnel |
| GCMSMS | 2011 | LBPE | Fonctionnel |
| Fermenteur 20 L | 2011 | LMB | Fonctionnel |
| Fermenteur 1000 L + 100 L | 2009 | Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche | 100 L Fonctionnel 1000 L Non Fonctionnel |
| Scanner Micro puce | 2009 | Service d'analyse | Fonctionnel |
| Centrifugeuse Continue | 2007 | Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche | Fonctionnel |
| Système de Chromatographie Liquide | 2006 | Service d'analyse | Fonctionnel |
| Système Bidimentionnel | 2006 | Service d'analyse | Fonctionnel |
| Microscope Confocale | 2006 | Service d'analyse | Non Fonctionnel |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Spetrometre de masse couplé LC/MS/MS | 2003 | Service d'analyse | Non Fonctionnel |
| Ultra Centrifugeuse | 2003 | Service d'analyse | Non Fonctionnel |
| Système de Chromatographie HPLC Préparative | 2003 | Service d'analyse | Fonctionnel |
| Molécular Imager | 2003 | Service d'analyse | Non Fonctionnel |
| Sequenceur d'acide Nucléique | 2003 | Service d'analyse | Non Fonctionnel |
| Fermenteur 300 L | 1983 | Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche | Fonctionnel |

## 7) Service de Maintenance :

**Membres de l'équipe :**

Mounir BOUATTOUR : Ingénieur
Mohamed MZID : Technicien Principal
Mouldi BEN ABOUDA : Technicien Principal
Riadh SOUISSI : Adjoint Technique
Haitham MILADI : Adjoint Technique

Durant l'année 2017, 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 équipements techniques des bâtiments (poste de transformation électrique 800 KVA, compresseur d'air à vis, de la station de traitement des eaux, la centrale de détection d'incendie, le groupe électrogène et de la climatisation centrale du centre.
- Le suivi d'exécution des contrats de maintenance pour les chambres froides, ascenseur, jardin et le système de détection d'incendie.
- L'élaboration de nouveaux contrats de maintenance pour les Equipements Scientifique : (Spectrophotomètre UV-1800 - Analyseur de carbone organique TOC –Balances – Fermenteurs - séquenceur HD -Chromatographie Liquide HPLC 1100 -Chromatographie Liquide HPLC 1200 - Chromatographie a Gaz couplée à spectromètre de masse GC-MS 6890)
- 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.
- La création d'une cellule de Métrologie dont la mission est d'établir les listes des parc d'instruments de pesage, volume et température et l'élaboration de contrat de maintenance
- Application du programme de la réduction de la consommation d'énergie, la réduction de consommation (Electricité – Eau).
- Préparation des dossiers techniques de l'entretien de l'infrastructure (Génie civil – peinture – parking – chaussée)

## 8) Coopération Internationale:

| Type de la Coopération | Nombre de Projets |
|---|---|
| Multilatérale | **7** |
| Bilatérale | **14** |
| Avec un Organisme International | **4** |

### a/ Coopération Multilatérale

Durant l'année 2017, Le CBS a été impliqué dans trois nouveaux projets dans le cadre de la coopération multilatérale avec l'UE relevant du programme H2020-MSCA-RISE- : EXANDAS ; IPM-4-CITRUS et COST ainsi que 2 autres projets BIOSMAN et BIOGASMENA dans le cadre de la coopération Tuniso-Euroméditéranéenne « ERANETMED ». Par ailleurs, il a continué à entretenir le projet « STomP » ARIMNET 2 dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed et le projet Tuniso-Japonnais SATREPS.

### b/ Coopération Bilatérale

Le CBS a été impliqué durant l'année 2017 dans 5 nouveaux projets bilatéraux dont 2 dans le cadre de la coopération Tuniso-Marocaine CMPTM, 2 dans le cadre de la Coopération Tuniso-Indienne et 1 projet PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française. Par ailleurs, il a continué à entretenir 9 autres projets dont : PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération Tuniso- Francaise (3) ; Coopération Tuniso-Allemande (3) coopération Tuniso- Sud-Africaine (1) et coopration Tuniso-Belge (1) ainsi que le projet LMI COSYS-Med sous tutelle de l'IRD(1).

### c/ Organismes internationaux

Durant l'année 2017, le CBS a bénéficié d'un Projet Américain USAID: Partnerships for Enhanced Engagement in Research « PEER » et a continué de bénéficier 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)

## 9) Ouverture du CBS sur son environnement national et international:

Durant l'année 2017, le CBS a signé des conventions avec des partenaires universitaires, socio-économiques ainsi qu'avec l'ANPR dans le cadre de programmes de financement nationaux **PRF** où le CBS est coordinateur:

1. **Projet PRF : PARADIS** intitulé : « Plateforme d'analyse Big Data pour l'évaluation des Risques d'allergies Alimentaires et d'aide à la Décission pour le Consommateur Tunisien »
2. **Projet PRF** intitulé : « Tests moléculaires à visée théranostique et diagnostique pour une meilleure prise en charge de patients atteints de Cancer »
3. **Projet PRF** intitulé : « Développement d'un éco-procédé pilote de culture de microalgues pour la séquestration du carbone, le traitement des eaux usées et la production de biocarburant »

A l'échelle nationale, le CBS a noué quatre nouvelles conventions avec les Sociétés industrielles locales suivantes: **i)GIPA-AGROMED** ; **ii)MEDIS** ; **iii)VIENAT** et **iv) EJM** et a continué sa collaboration avec les Sociétés : SOTULUB ; SEACNVS ainsi que la société SEDD.

A l'échelle internationale, le CBS a continué sa collaboration avec la société INRA transfert de France**.** De plus, le CBS a réalisé un bon nombre de prestations de services (analyses) au profit de partenaires académiques et socio-économiques.

## A/ Liste des missions A l'étranger en 2017:

| Nom et Prénom | Nom du Labo/ Projet | Pays | Durée |
|---|---|---|---|
| Basma Haj Kacem | LBME | France | Du 17 au 23 janvier |
| Sami Sayadi | Etranger | Allemagne | Du 18 au 21 janvier |
| Bassem Jaouadi | Tuniso / Algérien | Algérie | Du 15 au 20 mars |
| Sami Sayadi | CINEA | France | Du 06 au 09 avril |
| Bassem Jaouadi | Tuniso / Algérien | Algérie | Du 15 au 18 avril |
| Nadia Marrakchi | IPM4 Citrus | France | Du 25 au 29 avril |
| Slim Tounsi | LB | France | Du 25 au 29 avril |
| Souaad Rouis | LB | France | Du 25 au 29 avril |
| Saber Masmoudi | LPCMC | Allemagne | Du 08 au 14 mai |
| Ahmed Rebai | LPCMC | Gabon | Du 11 au 16 mai |
| Ali Gargouri | LBME | Italie | Du 13 au 19 mai |
| Mohamed Guerfeli | LBME | France | Du 14 au 18 mai |
| Slim Tounsi | LB | Italie | Du 15 au 18 mai |
| Sami Sayadi | IRD | France | Du 16 au 19 mai |
| Hafedh Belghith | LBME | France | Du 17 au 21 mai |
| Sami Sayadi | IRD | France | Du 14 au 16 juin |
| Slim Tounsi | LB | France | Du 28 juin au 02 juillet |
| Souad Rouis | LB | France | Du 28 juin au 02 juillet |
| Noureddine Allouch | ARIMNET 2 | France | Du 09 au 15 juillet |
| Slim Tounsi | ARIMNET 2 | France | Du 09 au 15 juillet |
| Sami Sayadi | CINEA | France | Du 09 au 14 juillet |
| Sami Sayadi | Etranger | Grèce | Du 20 au 24 septembre |
| Bassem Jaouadi | Tuniso / Algérien | Algérie | Du 23 au 30 septembre |
| Riadh Ben Salah | Tuniso / marocain | Maroc | Du 23 au 29 septembre |
| Slim Tounsi | LB | France | Du 02 au 04 octobre |
| Ali Gargouri | PHC-Utique | France | Du 23 au 29 octobre |
| Samir Bejar | LBMIE | Egypte | Du 31 octobre au 03 |
| Mariem Ellouze | LBPE | Belgique | Du 01 au 06 novembre |
| Raja Gargouri | LBME | France | Du 05 au 09 novembre |
| Mahdi Arbi | PHC-Utique | France | Du 13 au 19 novembre |
| Fathi Aloui | ERANETMED | Allemagne | Du 04 au 08 décembre |
| Lotfi Mellouli | LMB | France | Du 05 au 08 décembre |
| Sami Sayadi | INRA | France | Du 20 au 24 décembre |

## B/ Liste des Invités Etrangers en 2017 :

| Nom et Prénom | Nom du Labo hôte/ Projet | Pays | Durée |
|---|---|---|---|
| Stephan Dietrich | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 22 au 26 février |
| Eckhard Koch | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 22 au 26 février |
| Emna Habech | Tuniso / Algérien | Algérie | Du 24 mars au 24 avril |
| Bilel karawez | Tuniso / Algérien | Algérie | Du 24 mars au 24 avril |
| Gerber Vanessa Laura | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 16 au 22 avril |
| Rastegar Sepand | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 16 au 22 avril |
| Razika Hajij | Tuniso / Algérien | Algérie | Du 01 septembre au 31 |
| Clotilde Ferroud | PHC-Utique | France | Du 17 au 23 septembre |
| Maité Sylla | PHC-Utique | France | Du 17 au 23 septembre |
| Frédéric Debaste | LBPE | Belgique | Du 06 au 12 septembre |
| Moez rehimi | PHC-Utique | France | Du 29 septembre au 07 |
| Michel Torrijos | CMCU | France | Du 14 au 18 octobre |
| Rahima Sidi Boulenouar | LBAP | France | Du 07 au 10 novembre |
| Nadia Bertin | LBME | France | Du 07 au 09 novembre |
| Christophe Goze-bac | LB | France | Du 07 au 10 novembre |
| Asma Lazrag | Tuniso / marocain | France | Du 10 novembre au 09 |
| Imen Gamri | Tuniso / marocain | Marroc | Du 15 novembre au 15 |
| Stephan Scheurer | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 20 au 22 novembre |
| Stephan Vieths | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 20 au 22 novembre |
| Andrea Wangorsch | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 20 au 22 novembre |
| Moez Rehimi | PHC-Utique | France | Du 29 novembre au 07 |
| Vincent Cavailles | PHC-Utique | France | Du 29 novembre au 03 |
| Philipe Sousbie | PHC-Utique | France | Du 04 au 08 décembre |
| Jean-Jacques Godan | PHC-Utique | France | Du 04 au 08 décembre |
| Audrey Battimeli | PHC-Utique | France | Du 04 au 08 décembre |
| Faiçal Azayez | Tuniso / marocain | Marroc | Du 09 au 14 décembre |
| Gérard Lizard | LBME | France | Du 11 au 14 décembre |
| Abdesatar Asahour | Tuniso / marocain | Marroc | Du 17 au 23 décembre |

## C/ Stages à l'Etranger en 2017:

| Nom et Prénom | Nom du Labo/ Projet | Pays | Durée |
|---|---|---|---|
| Hela Safi | LBAP | Allemagne | Du 01 février au 31 mai |
| Sahar Sellami | LBAP | France | Du 01 février au 31 mai |
| Yosra Ben Salah | LB | France | Du 10 février au 30 mars |
| Karama Hamdi | Tuniso- coréenne | France | Du 13 au 17 février |
| Nizar Akrmi | PHC-Utique | France | Du 25 mars au 30 mai |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Aycha Koubaa | PHC-Utique | France | Du 30 mars au 30 mai |
| Hela Mkaouar | LBME | France | Du 01 avril au 30 septembre |
| Ami Jeblewi | PHC-Utique | France | Du 01 avril au 30 juin |
| Ines Ayadi | LBME | Portugal | Du 01 avril au 08 mai |
| Zouhaier Bouallegui | Etranger | Grèce | Du 25 avril au 25 mai |
| Lobna jlaeil | Etranger | Grèce | Du 01 au 31 mai |
| Amal Souissi | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 08 mai au 08 juillet |
| Lobna jlaeil | Etranger | Grèce | Du 01 juin au 01 juillet |
| Raouia Boujelben | LBPE | Espagne | Du 01 juin au 31 juillet |
| Mariem Chefi | LBPE | France | Du 01 juin au 31 juillet |
| Mariem Moala | LPCMC | Grèce | Du 04 au 18 juin |
| Ahlem Jbeli | LBPE | France | Du 18 au 25 juin |
| Sana Koubaa | LBAP | Allemagne | Du 15 septembre au 13 décembre |
| Mariem Cheffi | CMCU | France | Du 01 octobre au 30 novembre |
| Dora Hentati | CMCU | France | Du 01 octobre au 31 décembre |
| Mouna Jlidi | LBMIE | Espagne | Du 01 octobre au 30 novembre |
| Ameni Haj Mohamed | PHC-Utique | France | Du 02 octobre au 15 novembre |
| Slim Loukil | CMCU | France | Du 02 au 31 octobre |
| Mona Triki | PHC-Utique | France | Du 02 au 31 octobre |
| Sahar Sellami | LBAP | France | Du 10 octobre au 24 décembre |
| Raouia Boujelben | LBPE | Belgique | Du 22 octobre au 22 novembre |
| Mokhles Kouas | LBPE | France | Du 01 novembre au 02 février |
| Fatma Abdelmoula | PHC-Utique | France | Du 01 novembre au 16 décembre |
| Najoua Melik | CMCU | France | Du 02 novembre au 01 décembre |
| Wafa Jalouli | Tuniso / Allemand | Allemagne | Du 08 novembre au 09 décembre |
| Mohamed Najib Saïdi | LBAP | France | Du 09 au 23 novembre |
| Raja Gargouri | LBME | France | Du 02 novembre au 01 décembre |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ines yaakoubi | LBAP | France | Du 13 au 27 novembre |
| Nidhal Baccar | LBPE | France | Du 15 au 30 novembre |
| Firas Feki | Tuniso / Afrique du Sud | France | Du 20novembre au 01 décembre |
| Sonia Khoufi | Tuniso / Afrique du Sud | France | Du 20novembre au 01 décembre |
| Sana Koubaa | LBAP | Allemagne | Du 21 novembre au 24 décembre |
| Rawiya Boujelben | Tuniso / marocain | Marroc | Du 02 au 31 décembre |
| Ines Belhaj | LBME | France | Du 05 au 19 décembre |
| Hatem Zaghden | LBPE | France | Du 08 au 22 décembre |

## 10) Production Scientifique:

| | 2017 |
|---|---|
| Articles, Revues Internationales | **137** |
| Brevets nationaux | **13** |
| Brevets internationaux | **0** |
| Doctorats et Habilitations Soutenus | **24** |
| Mastères | **22** |
| PFE | **6** |

**Fig 2. Evolution des articles 2000-2017**

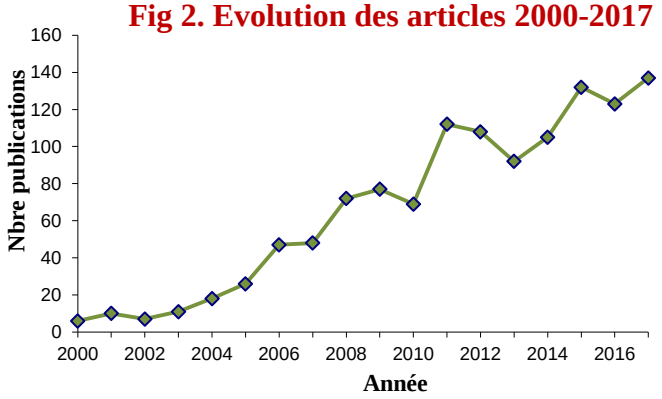
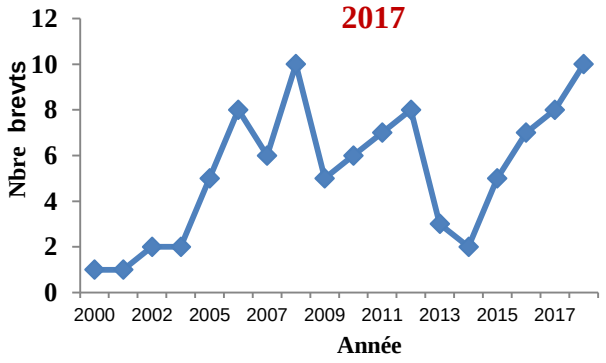



**Fig 3. Evolution des brevets 2000-2017**




## 11) Les journées scientifiques

1. Organisation d'un Workshop Tuniso-Allemand « Innovation in plant protection » en date du 23 Février 2017 à Sfax, Tunisie
2. Organisation au CBS d'une demi-journée d'information H2020 « Défis & Enjeux » en date du 11 Avril 2017
3. Organisation d'un Atelier Zebrafish au CBS dans le cadre du projet Tuniso-Allemand TUNGER du 17 au 20 avril 2017
4. Participation à l'organisation de la 3ème édition de L'ESBM 2017: Conférence internationale « Engineering Sciences for Biology and Medecine » du 4 au 7 Mai 2017 à Sfax, Tunisie
5. Participation à l'organisation de la 8ème conférence Internationale Arabe de l'Association des Biotechnologies Arabes: biodiversité, biosécurité et bioindustrie du 01 au 02 Novembre 2017 à Charm el-Cheikh- Egypte

6. Organisation des Journées LMI COSYS-Med, Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranéens du 6 au 8 Novembre 2017 à Hammamet, Tunisie.
7. Organisation d'un Workshop dans le cadre du projet TUNGER, au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) : Intitulé du Workshop: ''LIPID TRANSFER PROTEIN (LTP): AN INTERFACE BETWEEN PLANT DEFENCE AND HUMAN ALLERGY''en date du 21 Novembre 2017 à Sfax , Tunisie
8. Participation à l'organisation du «1st Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI) » qui a lieu du 22 au 25 Novembre 2017 à l'hôtel Mövenpick, Sousse, Tunisie
9. Organisation des 15ème Journées Internationales de Biotechnologie (IDB2018/JIB 2017) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) et ce du 18 au 22 décembre 2017 à Hammamet- Tunisie,

## 12) Prix et Distinctions

- Le Prix National de Recherche Scientifique et de Technologie 2017 a été décerné au *Prof. Sami SAYADI*, Directeur du LBPE-CBS, par le Président de la République, lors d'une cérémonie tenue le 21 Juillet 2017 au palais de Carthage, à l'occasion de la journée du savoir
- Le Prix Présidentiel de la meilleure thèse de doctorat 2017 a été décerné à *Dr Imen CHAKCHOUK*
- Le prix de la meilleure Femme chercheur 2017 par le Ministère de la Femme a été décerné à *Dr Jihen El EUCH*
- Le 2ème prix du meilleur projet de valorisation et de transfert (JNVR 2017) tenu les 13 et 14 au siège de l'UTICA Tunis obtenu par la Start-up Astrum Biotech a été décerné à *Mlle Manel Ben ALI & Dr Mamdouh Ben ALI*

# LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)

## مخبر الأساليب 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 | Post-doc |
| Abdelhafidh Dhouib | Professeur | Amal Zayen | Post-doc |
| Mohamed Chamkha | Professeur | Safa Souilem | Post-doc |
| Hatem Ben Ouada | Professeur (INSTM- Monastir) | Manel Ben Abdallah | Post-doc |
| Sonia Khoufi | Maître de conférences | Badreddine Barhoumi | Post-doc |
| Hatem Zaghden | M.A. | Fatma Hadrich | En Thèse |
| Zouhaier Bouallegui | M.A. | Hanen Chaari Kharrat | En Thèse |
| Ines Feki | M.A. (ISB-Sfax) | Alif Chebbi | En Thèse |
| Héla Ghorbel | M.A. (ISB-Sfax) | Amina Maalej | En Thèse |
| Nozha Abid | M.A. (FS-Sfax) | Asma Mahmoudi | En Thèse |
| Sonia Ben Younes | M.A. (FS-Gafsa) | Emna Feki | En Thèse |
| Samah Sellami | M.A. (FS-Gafsa) | Asma Saadallah | En Thèse |
| Firas Feki | Ingénieur général | Dorra Hentati | En Thèse |
| Fathi Aloui | Ingénieur général | Mariem Jeddi | En Thèse |
| Mohamed Ali Masmoudi | Ingénieur en chef | Mokhles Kouas | En Thèse |
| Manel Hamza | Technologue (ISET-Sfax) | Mouna Kehili | En Thèse |
| Sirine Choura | Ingénieur contractuel | Sabrine Ben Ouada | En Thèse |
| Najla Mhiri | Technicien principal | Hana Zouch | En Thèse |
| Slim Loukil | Technicien | Meriam Cheffi | En Thèse |
| Nidhal Baccar | Technicien | Raouia Boujelben | En Thèse |
| Fatma Ben Amor | Technicien contractuel | Najoua Kallel | En Thèse |
| Manel Chelbi | Technicien contractuel | Imen Siala | En Thèse |
| Sonia Kchaou | Préparateur | Imen Halouani | Mastère Rech. |
| Selma Kchaou | Secrétaire | Rabeb Naimi | Mastère Rech. |

## 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 et l'isolement et la caractérisation de nouvelles souches à partir de biotopes contaminés. Ceci nous a permis de définir des "états de l'art" et d'appliquer ces technologies pour la valorisation de plusieurs résidus et déchets liquides et solides au moyen de fermentations microbiennes. Les principaux objectifs du Laboratoire sont les suivants:

- Mettre l´art de l´ingénieur au service de la biologie et concevoir un réacteur biotechnologique pour un processus donné.
- Approfondir les connaissances sur les processus de dégradation de la matière organique dans les biotopes anaérobies ou aérobies et mettre en œuvre des souches microbiennes (bactéries et champignons) à hautes potentialités biotechnologiques, pour le traitement et la valorisation d´effluents ou de résidus agro-industriels.
- Exploiter des activités microbiennes pour la biodégradation de plusieurs rejets urbains et industriels (margines, abattoirs, hydrocarbures, détergents...) ainsi que leur valorisation par la production de molécules à haute valeur ajoutée.
- Caractériser des microorganismes (bactéries, champignons, micro-algues), particulièrement ceux isolés des milieux extrêmes, moyennant les outils classiques et moléculaires, ainsi que leurs

systèmes enzymatiques impliqués dans des réactions de synthèse, bioconversion ou biodégradation (biosurfactants, PHA, PHB, antioxydants…etc).

Les travaux réalisés durant l'année 2017 entrent dans le cadre de 5 projets, cités ci-dessous. Nous présentons dans ce rapport quelques exemples d'activités.

## INTITULE DES PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS

### 1. 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:

Le golfe de Gabès est situé au centre de la mer Méditerranée, sur la côte est de la Tunisie. Il est sous l'influence des apports anthropiques associés à une croissance démographique considérable dans la région. De nombreuses activités industrielles tels que le traitement du phosphate, l'industrie chimique du plastique, les tanneries libèrent dans le milieu marin leurs effluents contenant des contaminants tels que les métaux toxiques et les hydrocarbures.

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». 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 dans les échantillons d'eaux de surface ont été effectuées. Les résultats montrent que la contamination des eaux de surfaces par les ETMs et les hydrocarbures est considérée comme modérée. L'analyse de la diversité microbienne dans les sédiments et les eaux de surface prélevés dans la région de Sfax et de Gabès ont été réalisées par séquençage à haut débit (Miseq, Illumina) et les phyla les plus abondants, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Cyanobacteria*, ont été identifiés **(Fig. 1A et B)**. Une faible diversité de populations archéennes appartenant au phyla *Euryarchaeota*, *Crenarcheaota* et *Parvarcheaota*, a été également détectée **(Fig. 1A et B)**. Les résultats montrent que les communautés bactériennes dans les eaux de surfaces et les sédiments marins les plus diversifiées se trouvent respectivement dans les stations situées dans les régions de Gabès et de Sfax-Nord. Par ailleurs, différents gènes impliqués dans les mécanismes de résistances aux éléments traces métalliques (e.g. *cadA*, *merA*) et dans la dégradation des hydrocarbures (e.g. *alkB*) seront également ciblés. Ces études permettront d'évaluer l'impact de la pollution sur la diversité microbienne dans les écosystèmes pollués dans les zones de Sfax et le Golfe de Gabès, en général.

#### - Exemple 2: Valorisation du phosphogypse par production d'hydrogène sulfuré par les 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 d'acide phosphorique génère des quantités importantes de phosphogypse (PG) 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 ($CaSO4$, $2H_2O$) (plus de 70%), et de teneurs variables en impuretés, telles que la silice, le fluor, etc., d'où l'idée de sa valorisation par extraction du soufre avec des bactéries sulfato-réductrices et sulfo-oxydantes. Afin d'évaluer la diversité et la capacité des

microorganismes anaérobies marins à convertir les sulfates provenant du PG en sulfure d'hydrogène ($H_2S$), différentes cultures par enrichissement de BSR ont été réalisées à partir de sédiments marins en testant trois donneurs différents d'électrons (acétate, formiate, lactate) et deux sources de sulfates (PG et $Na_2SO_4$). Les résultats ont montré que les BSR appartenant à l'ordre des *Desulfovibrionales* (classe *Deltaproteobacteria*), plus particulièrement au genre *Desulfovibrio*, étaient dominantes **(Fig. 1D)**. Cette étude a permis non seulement de démontrer la capacité des microorganismes marins à biotransformer le PG, mais également a permis de décrire pour la première fois la diversité microbienne indigène du phosphogypse par séquençage haut-débit des gènes codant l'ARNr 16S. La communauté microbienne indigène du PG était principalement composée de *Proteobacteria* et *Firmicutes*, avec des archées affiliées à l'ordre des *Methanomassiliicoccales*, également détectées dans des environnements impactés par les drainages acides miniers **(Fig. 1C)**. Ces résultats offrent des perspectives intéressantes pour améliorer les techniques de valorisation et de dépollution du PG en utilisant des microorganismes marins et anaérobies.

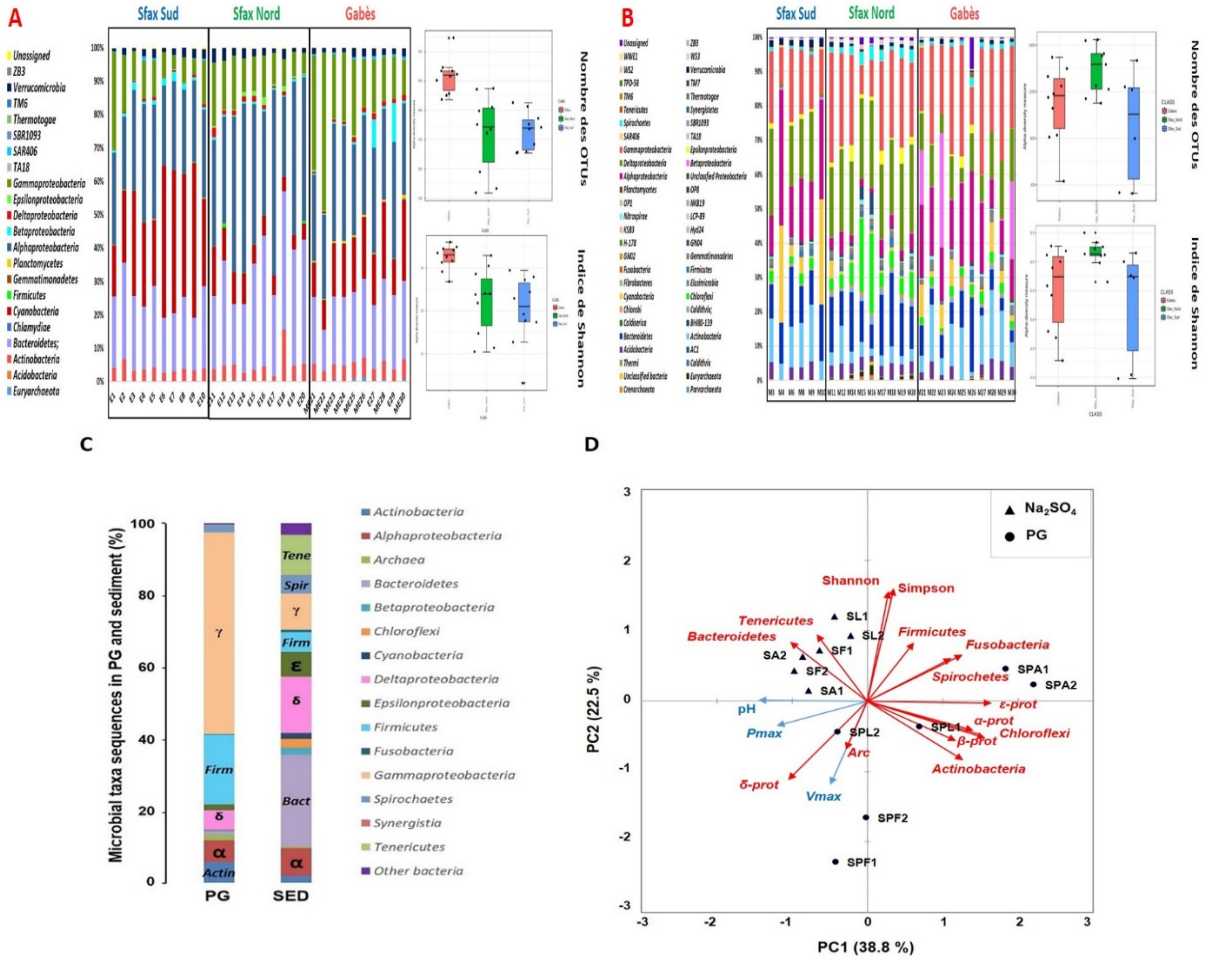



**Fig. 1:** Diversité des communautés microbiennes dans les échantillons d'eaux de surface (A) et de sédiments marins (B); Diversité des communautés microbiennes dans les échantillons de sédiments et du phosphgypse (C) (phylum/classe); Biplot de l'analyse en composantes principales (ACP) montrant la variation entre les cultures d'enrichissement en fonction de la production d'hydrogène sulfuré et l'abondance relative des taxons microbiens (D).

### - Exemple 3: Traitement des effluents de tannerie par des procédés combinés:

Ces travaux sont focalisés sur les traitements combinés des effluents de tanneries comportant les procédés biologiques, par voie fongique et les procédés physico-chimiques faisant appel à l'adsorption des polluants et à la microfiltration. Nous avons étudié et appliqué des prétraitements en vue de

l'amélioration du traitement biologique ultérieur de deux effluents de l'industrie de tanneries: l'effluent concentré, dit de tannage, caractérisé par un pH acide, une DCO de l'ordre de 4 g/l et chargé en métaux lourds, essentiellement le Cr (allant jusqu'à 2 g/l) et dépassant les normes de rejet pour tous les paramètres; et l'effluent final résultant de la récupération de l'eau usée après toutes les étapes. Ce dernier est caractérisé par un pH basique et une DCO allant de 3 à 8 g/l. Il est moins chargé en Cr (mais qui dépasse toujours la norme de rejet) et chargé en $H_2S$ (0,7 g/l).

Les prétraitements biologiques utilisant des cultures d'*Aspergillus niger* ont montré une nette diminution de la pollution organique en termes de DCO (70% et 50% pour l'effluent final et de tannage, respectivement) **(Tableau 1)**. Une diminution importante de la concentration en métaux lourds, essentiellement le Cr et qui est attribuée à un phénomène d'adsorption, a été également enregistrée. En outre, l'utilisation de cultures de *Trametes versicolor* testées comme cellules libres et immobilisées a permis une diminution importante de la DCO qui est meilleure dans le cas des cultures immobilisées.

**Tableau 1:** Efficacité des prétraitements fongiques des effluents de tanneries: Abattement en %.

| | ***Aspergillus niger*** | | ***Trametes versicolor*** | |
|---|---|---|---|---|
| | Effluent final | Effluent de tannage | Effluent final | Effluent de tannage |
| DCO | 70 | 50 | 75 | 45 |
| $DBO_5$ | 65 | 39 | 70 | 48 |
| Cr | 92 | 96 | 84 | 92 |
| Toxicité | 80 | 82 | 79 | 75 |

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

L'industrie GCT (Groupe Chimique Tunisien) de transformation du phosphate de Sfax génère des odeurs nauséabondes entraînant des nuisances aux ouvriers et fonctionnaires de l'usine, ainsi qu'aux habitants des alentours. Ces odeurs désagréables sont dues essentiellement au sulfure d'hydrogène et aux mercaptans. Des consortiums bactériens capables de croître sur les eaux de lavage, à 55 °C et 37 °C, ont été adaptés et nous avons pu isoler et caractériser les bactéries aérobies suivantes: la souche CAN55 de *Bacillus licheniformis*, la souche CAT37 de *Brevibacillus agri* et la souche SH6 de *Staphylococcus capitis*, qui sont capables d'utiliser plusieurs mercaptans comme seule source de carbone et d'énergie. La biodégradation de certains alcanethiols a été, également, élucidée.

D'autre part, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) posent des problèmes environnementaux à cause de leurs propriétés toxiques et cancérigènes, ainsi que leur faible biodégradabilité. À partir des sols contaminés par des hydrocarbures, des consortiums microbiens actifs sur différents HAPs ont été adaptés, après plusieurs étapes de cultures par enrichissements. Un consortium CSMP1 sélectionné, a pu dégrader jusqu'à 99% du phénanthrène (200 mg/l), un HAP à 3 noyaux benzéniques, après 7 jours d'incubation à 37 °C et 180 rpm. Des intermédiaires clefs de cette biodégradation ont été également identifiées par GC-MS. En outre, nous avons pu isoler, sur le phénanthrène utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, une souche bactérienne W10, aérobie, mésophile et affiliée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Moyennant les analyses GC-MS, nous avons confirmé que la souche W10 est capable d'utiliser le phénanthrène, comme seule source de carbone et d'énergie. En effet, elle a pu dégrader en aérobiose 80% de cet HAP à 200 mg/l, après 30 jours d'incubation à 37 °C. Elle est aussi capable de réduire la tension de surface de 56,1 à 42 mN/m, après 4 jours d'incubation à 37 °C. Par ailleurs, la souche W10 a montré un potentiel

intéressant de croître sur une large gamme d'hydrocarbures (aliphatiques, monoaromatiques, polyaromatiques et complexes), des huiles végétales et des huiles usagées, utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie. Des intermédiaires métaboliques de biodégradation du phénanthrène et du fluornathène, par la souche W10, ont été mis en évidence, et des voies cataboliques ont été alors proposées.

Suite à des essais de production de biosurfactant(s) par la souche W10 sur différents substrats, l'huile d'olive a montré une meilleure réduction de la tension de surface, après 2 jours d'incubation. Un biosurfactant a été alors produit sur ce substrat, utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Une production de 2 g du bio-tensioactif brut/l du milieu de culture a été obtenue, après 2 jours d'incubation à 37 °C. Ce biosurfactant brut (BSW10) est capable de réduire la tension de surface de l'eau de 72 mN/m à 31 mN/m, en présence de sa CMC qui est de l'ordre de 0,04% (m/v). Le produit a montré des stabilités intéressantes de la tension de surface, de l'indice d'émulsification et du déplacement d'huile dans une large gamme de température (4-100 °C) et de pH (2-12). Ce biosurfactant possède également une tolérance élevée *vis-à-vis* du NaCl (0-15%, m/v). Des essais d'application de BSW10 par remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols contaminés ont été réalisés, montrant ses capacités marquantes par rapport à des surfactants chimiques.

Dans un autre volet du travail; Le biofilm microbien peut être extrêmement problématique en industries, comme par exemples, l'industrie pétrolière ou le secteur de l'agroalimentaire. En effet, il peut entraîner, par exemples, la biocorrosion des surfaces et le colmatage des systèmes de filtration. Nous nous sommes intéressés dans cette partie d'étude, en premier lieu, à explorer la production et analyser les biosurfactants synthétisés par les souches W10, SH6, CAN55 et CAT37, moyennant des méthodes analytiques (ESI-MS et MALDI-TOF-MS). Nous avons également étudié, la capacité des biosurfactants, des rhamnolipides en particulier, produits par la souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa*, à inhiber ou perturber la formation des biofilms sur des surfaces de polystyrène et d'acier inoxydable, causés par les souches CAN55, SH6 et la culture mixte de CAN55, SH6 et W10. La souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa* a montré le potentiel de produire des rhamnolipides avec une production de 9,7 g/l sur le glycérol, supérieure à celle de la souche de référence PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, avec une prédominance de dirhamnolipide (Rha-Rha-C10-C10; MM=649). En outre, la microscopie en fluorescence «LIVE/DEAD BacLight» a confirmé les activités inhibitrices des rhamnolipides **(Fig. 2)**. En plus, une fraction pure du dirhamnolipide (MM = 649) s'est avérée être impliquée dans l'inhibition de la souche CAN55 de *B. licheniformis* avec une valeur CMI de 1 mg/ml, inférieure à la valeur de CMI pour les rhamnolipides semi-purifiés. Par ailleurs, ces rhamnolipides appliqués à une concentration de 1 mg/ml sur de l'acier inoxydable, qui est largement utilisé dans des tuyauteries industrielles, ont montré la capacité d'inhiber jusqu'à 99% des biofilms formés après 48 h par *Bacillus licheniformis* CAN55, *Staphylococcus capitis* SH6, la souche productrice elle-même W10, et la co-culture mixte composée de ces 3 souches (1:1:1) **(Fig. 3)**.

L'ensemble de ces résultats, prometteurs, montrent que les souches bactériennes CAN55, CAT37, SH6, et W10, le consortium CMP1, ainsi que les biosurfactants RHW10, demeurent d'intérêts biotechnologiques pour divers types d'applications, tels que la biodégradation des mercaptans, la bioremédiation des sites pollués par différents hydrocarbures, et les activités anti-biofilm et anti-adhésive.

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

Nous nous sommes intéressés à l'étude de la production en masse des microalgues en utilisant des eaux usées urbaines. Une microalgue *Scenedesmus* sp., isolée du Nord Est de la Tunisie et sélectionnée pour sa tolérance aux eaux usées et sa haute productivité a été utilisée dans cette étude. Trois raceways, d'échelle pilote et de surface de l'ordre de 7,2 m², ont été employés. Les paramètres température, pH, oxygène dissous et intensité lumineuse ont été mesurés et contrôlés en ligne et les données ont été automatiquement enregistrées.

Dans le but de connaître les facteurs potentiellement contrôlables pouvant influencer la performance des cultures de *Scenedesmus* sur les eaux usées, nous avons comparé le pouvoir épurateur et la productivité de la souche sous différentes conditions: Différentes concentrations en digestât (30, 45 et 60%), différentes profondeurs de culture (5, 10 et 15 cm) et deux taux de dilution (0,2 et 0,3 1/jour). L'effluent brut provient d'une station d'épuration des eaux usées urbaines. Il présente une concentration en ammonium de 628 mg/l, en nitrate de 7,2 mg/l et en phosphore de 64 mg/l. Les 3 cultures ont été d'abord opérées en batch puis en mode continu. Le mode continu a été maintenu jusqu'à atteindre la phase stationnaire.

Les résultats relatifs à la productivité et l'activité photosynthétique montrent une adaptation et une tolérance de la souche aux conditions climatiques réelles en système ouvert. En effet, la variation de la température, l'intensité lumineuse et la durée d'éclairage lors de la journée et pendant la durée de la culture peut créer un stress affectant la performance de la souche en culture extérieure **(Fig. 4)**. Un maximum de productivité de 22,9 g/m².jour a été déterminé à 30% digestât, 0.3 1/jour et 15 cm de profondeur. Il est important de noter que des bactéries ainsi que quelques chlorophycées ont été révélées par observation microscopique, mais la souche *Scenedesmus* sp. demeure la souche dominante. Un phénomène de nitrification a probablement eu lieu dans certains essais où la concentration finale de nitrate a augmenté par rapport à la concentration initiale. Par ailleurs, plus la charge d'entrée en ammonium était élevée, plus la concentration de sortie en ammonium serait élevée. Une corrélation est notée, également, entre l'augmentation de la profondeur de la culture et celle de la concentration finale d'ammonium.

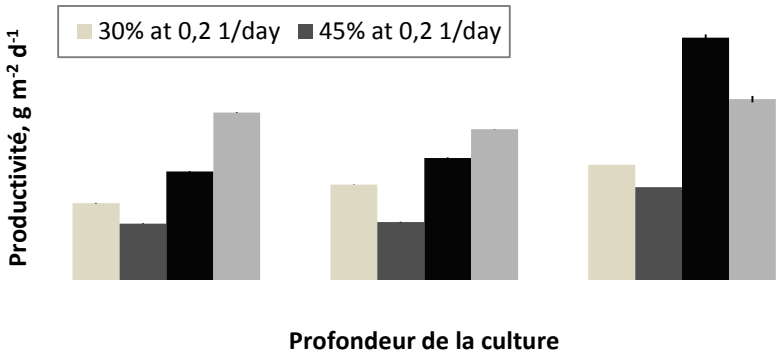



**Fig. 4:** Variation de la productivité en biomasse microalgale en fonction de la profondeur de la culture, la concentration du digestât liquide dans le milieu et du taux de dilution appliqué.

Les vitesses d'élimination des nutriments en fonction du taux de dilution et les différentes concentrations en digestât testées, ont été déterminées. En ce qui concerne l'azote, le taux d'élimination a augmenté à mesure que le taux de dilution et la profondeur de culture augmentaient. Plus le pourcentage de digestât était élevé dans le milieu, plus le taux d'élimination était maximal: 5,2 g N/m².jour ou 34,7 mg N/l.jour, avec 15 cm de profondeur, 0,3 1/jour et 45% de digestât. Pour le phosphore, les résultats ont montré qu'aucune tendance spécifique ne pouvait être observée en corrélation entre la vitesse d'élimination et le pourcentage de digestât, alors qu'elle augmentait à mesure que le taux de dilution augmentait et inversement avec la profondeur de culture. Le taux

maximal d'élimination du phosphore de 2,34 g P/m².jour a été obtenu en utilisant 30% d'effluent et 0,3 1/jour, avec 5 cm de profondeur d'étang.

Pour la biomasse produite, nous avons effectué des analyses de la teneur en lipides et du profil des acides gras à 0,3 1/jour, en fonction de la variation du pourcentage de digestât dans le milieu et la profondeur de la culture. Aucune tendance particulière ne pouvait être observée avec ces deux paramètres. La plus forte teneur en lipides de 10,1% MS, correspondant à une productivité lipidique de 2,3 g/m².jour, a été déterminée pour 15 cm de profondeur d'étang en utilisant 30% d'effluent. Par ailleurs, la teneur en acides gras allait de 2,3 à 4,5% en MS, sans tendance particulière qui pourrait être observée en fonction de la profondeur, alors qu'elle diminue à mesure que le pourcentage d'effluent augmentait dans le milieu. Les acides gras à chaîne courte C16: 0, C18: 0, C18: 1n7 et C18: 3n3 présentaient une prédominance significative.

La souche native *Scenedesmus* sp. semblait être un bon candidat pour la culture en système ouvert car elle a montré une robustesse et une tolérance aux conditions de culture extérieure. Les conditions optimales de culture étaient de 30% de digestât, 0,3 1/jour et 15 cm de profondeur de la culture. Une productivité maximale de la biomasse de 22,2 g/m².jour a été obtenue, correspondant à une estimation de 80 tonnes/ha.an. Un procédé à base de microalgues pourrait contribuer de façon significative au traitement des eaux usées conventionnelles dans une station de traitement des eaux usées offrant une approche de bioremédiation rentable et écologique (élimination de 10,8 tonnes N/ha.an et 2,2 tonnes P/ha.an). Une teneur en lipides de 10,01% avec une productivité de 2,3 g/m².jour a été déterminée, correspondant à une estimation de 8,28 tonnes /ha.an, avec un profil d'acides gras favorable à la production de biocarburants.

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

Dans l'objectif de développer une stratégie de gestion intégrée et durable des déchets ménagers ciblée vers la valorisation bioénergétique, une étude de l'amélioration du potentiel méthane des déchets ménagers organiques (DMO) a été réalisée tout en appliquant deux approches: la co-digestion et le prétraitement physico-chimique. La première partie de ce travail a été consacrée à l'optimisation de la co-digestion de la DMO avec la fiente de volaille (FV) *via* la méthode des plans d'expérience. Dans la deuxième partie du travail nous avons étudié l'effet du prétraitement par ultrasonication (US) sur la solubilisation de la MO et par conséquent sur le rendement en méthane. Une fermentation en réacteur discontinu a été conduite sur le DMO brut et celui prétraité par ultrasonication.

Suite à une caractérisation physico-chimique des substrats (DMO et FV) et d'un inoculum anaérobie (INO), des fermentations anaérobies en batch ont été conduites avec différentes combinaisons déterminées selon le plan de mélange (mixture design). Le volume du méthane cumulé produit par les différentes fermentations était significatif dès le premier jour de la digestion. De même, la production du méthane a été améliorée par l'ajout de l'inoculum aux deux substrats. Les mono-fermentations du DMO et de la FV ont donné des faibles volumes de méthane respectivement de 89 et 176,5 ml. Par contre, la co-digestion des mélanges a amélioré la production du méthane (volume du méthane entre 260 et 327 ml). Ceci témoigne donc que l'ajout du FV, comme co-substrat riche en azote, améliore la méthanisation du DMO. En effet, une meilleure production de biogaz de l'ordre de 327 ml a été obtenue par le batch 1/3 (DMO+FV+INO). A la fin de cette dernière fermentation, le digestât a été caractérisé par un pH au alentour de la neutralité, une concentration en AGV de 0,3 g/l et une alcalinité totale <5 g/l. Ces résultats témoignent bien la stabilité du processus de la digestion anaérobie.

Pour prédire statistiquement la meilleure combinaison des différents éléments testés (DMO, FV et INO), le modèle QUARTIC a été appliqué. L'analyse de la variance a permis de confirmer la validité du modèle (F = 0,0249). Les courbes iso-réponses, dans le plan et en 3D sont représentées dans la **Fig. 5**. Il en résulte que la meilleure combinaison pour une production maximale de méthane (360 ml) est la suivante: 21,8% DMO + 44,4% FV + 33,8% INO. Cette combinaison a été conduite expérimentalement pour confirmer les résultats. L'ajout du substrat azoté FV accélère la biodégradabilité du mélange et par conséquent le processus de la digestion anaérobie. L'addition d'inoculum a été, également, démontrée importante, et qui est expliquée par sa richesse en méthanogènes.

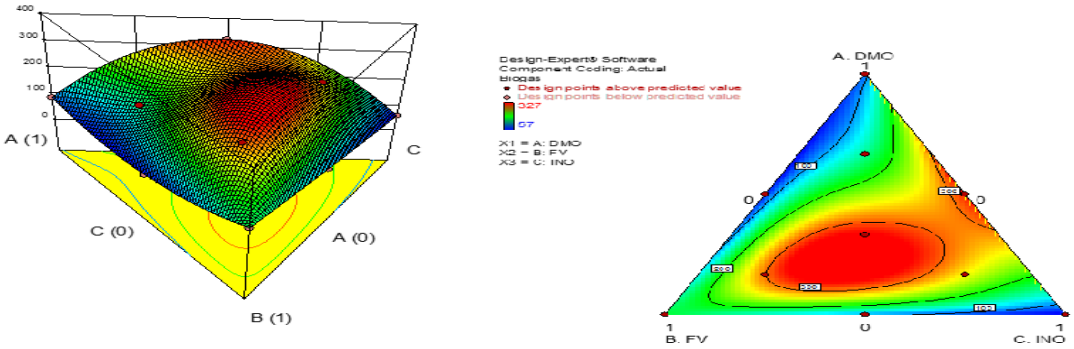



**Fig. 5:** Les courbes iso-réponses dans le plan et en 3D.

Concernant le prétraitement par US, une solubilisation maximale de la MO a été obtenue après 20 min d'hydrolyse avec des pourcentages d'augmentation de la DCO et des sucres réducteurs de 62% et de 53%, respectivement. Les tests BMP du DMO brut et préhydrolysé ont montré l'amélioration du rendement en méthane suite à un prétraitement par US qui atteint une valeur de 875 ml/g MV. Ce rendement est 2,25 fois plus important que celui du DMO brut. Ces résultats ont été aussi confirmés à l'échelle d'un réacteur discontinu de 6 l.

En conclusion, les deux approches utilisées pour améliorer la méthanisation du DMO, la co-digestion et l'US, ont abouti à une augmentation significative des rendements en méthane. La comparaison des résultats montre que la co-digetion est plus fiable puisque le rendement a augmenté de 4 fois, de plus le coût de cette approche est négligeable par rapport à la méthode US qui est coûteuse.

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

Les produits de l'olivier offrent d'excellentes possibilités d'exploitation en raison de leur richesse en composés phénoliques destinés à des applications dans les domaines alimentaire et biomédical. Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation biologique des extraits de fruits d'olivier et ce dans l'optique de produire des produits pourvus d'activités biologiques.

Dans un premier temps, on s'est intéressé à l'extraction et la caractérisation phytochimique des composés phénoliques à partir de différentes variétés tunisiennes d'olives. La composition phénolique a été étudiée moyennant des techniques analytiques (HPLC et LC-MS/MS) et le potentiel antioxydant a été évalué moyennant des dosages colorimétriques (DPPH, FRAP et ABTS). Nous nous sommes amenés par la suite à mettre en évidence les activités antioxydante et anticancéreuse des extraits de fruits *vis-à-vis* des lignées cellulaires humaines cancéreuses MCF-7 (cancer de sein), HepG-2 (cancer de foie) et Caco-2 (cancer de colon).

Les résultats obtenus ont démontré que les produits de l'olivier sont dotés d'activités antioxydante et antiproliférative intéressantes. Afin d'approfondir davantage notre étude et vérifier si l'effet

antiprolifératif de l'extrait est la conséquence d'un arrêt du cycle cellulaire, la cytométrie en flux a été utilisée dans le but de quantifier le contenu en ADN des cellules et déterminer ainsi leur répartition dans les différentes phases du cycle.

Etant donné que l'activation de l'apoptose dans les cellules cancéreuses est l'une des stratégies de traitement les mieux adoptées contre le cancer, la suite de ce travail a été consacrée à la mesure de l'apoptose par l'étude de l'activation des caspases moyennant le test des multicaspases. Afin de mieux analyser le mécanisme apoptotique résultant du traitement des cellules avec l'extrait d'olivier, l'évaluation du niveau de phosphorylation des protéines Erk (Extracellar signal regulated kinases) et Akt (protéine kinase B), ainsi que l'expression de p53, a été réalisée **(Fig. 6)**. Les données de cette étude ont montré que le potentiel apoptotique de l'extrait d'olivier sur les cellules Caco-2 était plus significatif avec un effet plus notable sur les cellules Caco2 par rapport aux cellules HepG2.

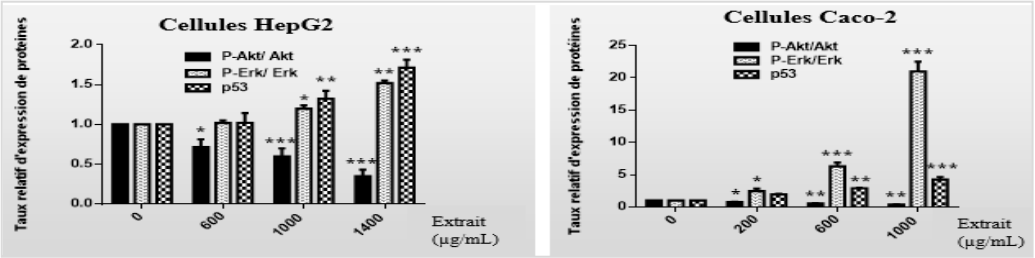



**Fig. 6:** Effet de l'extrait d'olivier sur les voies de Akt, Erk et p53.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes proposé d'étudier le rôle protecteur de l'extrait contre l'apoptose induite par l'ajout du $H_2O_2$ chez les cellules rénales saines HEK-293. On s'est intéressé au mécanisme moléculaire par lequel l'extrait d'olives protège la prolifération de ces cellules. Les dosages intracellulaires des marqueurs du stress oxydatif ont montré une élévation des taux de TBARS et ROS dans les cellules HEK-293 incubées avec le $H_2O_2$. L'évaluation de l'activité des caspases moyennant la cyrtométrie en flux a montré une augmentation du pourcentage des cellules apoptotiques, témoignant d'un effet apoptotique du $H_2O_2$ *vis-à-vis* des cellules. Toutefois, l'extrait d'olives a pu minimiser significativement cet effet d'une manière dose-dépendante **(Fig. 7)**.Cet effet apoptotique a été par la suite vérifié par des analyses western blot et Q-PCR de certains marqueurs de l'apoptose.

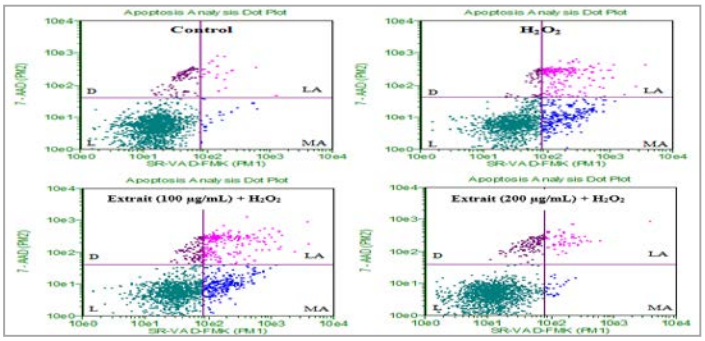



**Fig. 7:** Analyse de l'apoptose par l'essai des multicaspaces

## - Publications dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture:

**1)** Affes, M., Aloui, F., Hadrich, F., Loukil, S., Sayadi, S. **(2017)**. Effect of bacterial lipase on anaerobic co-digestion of slaughterhouse wastewater and grease in batch condition and continuous fixed-bed reactor. *Lipids in Health and Disease*, 16 (1): 195. doi: 10.1186/s12944-017-0587-2.

**2)** Ben Moussa, I.D., Athmouni, K., Chtourou, H., Ayadi, H., Sayadi, S., Dhouib, A. **(2017)**. Phycoremediation potential, physiological, and biochemical response of *Amphora subtropica* and *Dunalilla* sp. Nickel pollution. *J. Appl. Phycol.*, doi: 10.1007/s10811-017-1315-z.

**3)** Boudabbous, M., Saibi, W., Bouallagui, Z., Dardouri, M., Sayadi, S., Belghith, H., Mechichi, T., Gargouri, A. **(2017)**. Fast activated charcoal prepurification of *Fusarium solani* β-glucosidase for an efficient oleuropein bioconversion. Preparative *Biochemistry and Biotechnology*, 47 (2): 185-191.

**4)** Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., Sayadi, S., Chamkha, M., Banat, M. I. **(2017)**. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *J. Basic Microbiol.*, 57 (5): 364-375. doi: 10.1002/jobm.201600658.

**5)** Chebbi, A., Hentati, D., Cheffi, M., Bouabdallah, R., Choura, C., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2017).** Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* doi: 10.1002/jctb.5508.

**6)** Chebbi, A., Hentati, D., Zaghden, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2017).** Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 122: 128-140. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.05.006.

**7)** Dahmen, I., Ben Moussa, I., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S., Dhouib, A. **(2017)**. Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology*, 238: 325-332.

**8)** Elshikh, M., Funston, S., Chebbi, A., Ahmed, S., Marchant, R., Banat, I. M. **(2017)**. Rhamnolipids from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* E264: Physico-chemical characterization, antimicrobial and antibiofilm efficacy against oral hygiene related pathogens. *New Biotechnol.*, 36: 26-36. doi: 10.1016/j.nbt.2016.12.009.

**9)** Fourati, R., Tedetti, M., Guigue, C., Goutx, M., Garcia, N., Zaghden, H., Sayadi, S., Elleuch, B. **(2017)**. Sources and spatial distribution of dissolved aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface coastal waters of the Gulf of Gabès (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). *Progress in Oceanography*, doi:10.1016/j.pocean.2017.02.001.

**10)** Fourati, R., Tedetti, M., Guigue, C., Goutx, M., Zaghden, H., Sayadi, S., Elleuch, B. **(2017)**. Natural and anthropogenic particulate-bound aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters of the Gulf of Gabès (Tunisia, southern Mediterranean Sea). *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (3): 2476-2494. doi: 10.1007/s11356-017-0641-7.

**11)** Jemli, M., Zaghden, H., Rezgi, F., Kchaou, S., Aloui, F., Sayadi, S. (**2017)**. Biotreatment of petrochemical wastewater: a case study from Northern Tunisia. *Water environment research*, 89(3): 228-237. doi: 10.2175/106143016X14609975746082.

**12)** Karray, R., Karray, F., Loukil, S., Mhiri, N., Sayadi, S. **(2017)**. Anaerobic co-digestion of Tunisian green macroalgae *Ulvarigida* with sugar industry wastewater for biogas and methane production enhancement. *Waste Management*, 61: 171-178.

**13)** Kehili, M., Choura, S., Zammel, A., Allouche, N., Sayadi, S. **(2017)**. Oxidative stability of refined olive and sunflower oils supplemented with lycopene-rich oleoresin from tomato peels industrial by-product, during accelerated shelf-life storage. *Food Chemistry*, 246: 295-304.

**14)** Kehili, M., Kammlott, M., Choura, S., Zammel, A., Zetzl, C., Smirnova, I., Allouche N., Sayadi, S. **(2017)**. Supercritical $CO_2$ extraction and antioxidant activity of lycopene and β-carotene-enriched oleoresin from tomato (*Lycopersicum esculentum L.*) peels by-product of a Tunisian industry. *Food and Bioproducts Processing*, 102: 340-349.

**15)** Keskes, H Belhadj, S Jlail, L., El Feki, A., Damak, M., Sayadi, S., Allouche, N. **(2017)**. LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts and fractions from Tunisian *Juniperus Phoenicea* leaves. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1): 88-95.

**16)** Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., El Feki, A., Sayadi, S., Allouche, N. **(2017)**. LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts of Tunisian Fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum* L.) Seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-12. doi:10.1007/s11694-017-9632-0

**17)** Kouas, M., Torrijos, M., Sousbie, P., Steyer, J.P., Sayadi, S., Harmand, J. **(2017)**. Robust assessment of both biochemical methane potential and degradation kinetics of solid residues in successive batches. *Waste Management*, 70: 59-70.

**18)** Kharrat, H., Karray, F., Bartoli, M., Ben Hnia, W., Mhiri, N., Fardeau, M.L., Bennour, F., Kammoun, L., Alazard, D., Sayadi, S. **(2017)**. *Desulfobulbus aggregans* sp. nov., a novel sulfate reducing bacterium isolated from marine sediment from the gulf of Gabes. *Current microbiology*, 74 (4): 449-454.

**19)** Maalej, A., Bouallagui, Z., Hadrich, F., Isoda, H., Sayadi, S. **(2017)**. Assessment of *Oleaeuropaea* L. fruit extracts: Phytochemical characterization and anticancer pathway investigation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90: 179-186.

**20)** Maalej, A., Forte, M., Bouallagui, Z., Donato, S., Mita, L., Mita, D.G., Filosa, S., Crispi, S., Sayadi, S. **(2017)**. Olive compounds attenuate oxidative damage induced in HEK-293 cells via MAPK signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 39: 18-27.

**21)** Maalej, A., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Feki, I., Marrakchi, R., Sayadi, S. **(2017)**. Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicitythrough regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 106: 455-465.

**22)** Mechri, S., Ben Elhoul, M., Omrane Benmrad, M., Zaraî Jaouadi, N., Rekik, H., Chebbi, A., Sayadi, S., Chamkha, M., Bejar, S., Jaouadi, B. **(2017)**. Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* VP3 with potential biotechnological interest. *Int. J. Biol. Macromol.*, 94 (Pt A): 221-232. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112.

**23)** Mechri, S., Kriaa, M., Ben Elhoul Berrouina, M., Omrane Benmrad, M., Zaraî Jaouadi, N., Bouacem, K., Bouanane-Darenfed, A., Chebbi, A., Sayadi, S., Chamkha, M., Bejar, S., Jaouadi, B. **(2017).** Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. *Int. J. Biol. Macromol.*, 101: 383-397. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.051.

**24)** Mekki, A., Aloui, F., Sayadi, S. **(2017)**. Influence of biowastes compost amendment on soil organic carbon storage under arid climate. *Journal of the Air & Waste Management Association*, doi: 10.1080/10962247.2017.1374311.

**25)** Mekki, A., Arous, F., Aloui, F., Sayadi, S. **(2017)**. Treatment and valorization of agro-wastes as biofretilizers. *Waste Biomass Valor.*, 8: 611-619.

**26)** Mekki, A., Sayadi, S. **(2017)**. Study of heavy metal accumulation and residual toxicity in soil saturated with phosphate processing wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228 (6): 215. doi: 10.1007/s11270-017-3399-0.

**27)** Mnif, S., Chebbi, A., Mhiri, N., Sayadi, S., Chamkha, M. **(2017)**. Phenanthrene degradation by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. *Process Saf. Environ. Prot.*, 107: 44-53. doi: 10.1016/j.psep.2017.01.023.

**28)** Smaoui, Y., Mlaik, N., Bouzid, J., Sayadi, S. **(2017)**. Improvement of anaerobic digestion of landfill leachate by using coagulation-flocculation, Fenton's oxidation and air stripping pretreatments. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, doi: 10.1002/ep.12781.

**29)** Souilem, S., Fki, I. Kobayashi, I., Khalid, N., Neves, M.A. Isoda, H., Sayadi, S., Nakajima, M. **(2017)**. Emerging technologies for recovery of value-added components from olive leaves and their applications in food/feed industries. *Food and Bioprocess Technology*, 10 (2): 229-248.

**30)** Zaghden, H., Tedetti, M., Sayadi, S., Serbaji, M.M., Elleuch, B., Saliot, A. **(2017)**. Origin and distribution of hydrocarbons and organic matter in the surficial sediments of the Sfax-Kerkennah channel (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 117 (1): 414-428.

**31)** Zili, F., Bouzidi, N., Ammar, J., Zakhama, W., Ghoul, M., Sayadi, S., Ben Ouada, H. **(2017)**. Mixotrophic cultivation promotes growth, lipid productivity, and PUFA production of a thermophilicchlorophyta strain related to the genus *Graesiella*. *J. Appl. Physiol.*, 29: 35-43.

**32)** Zouch, H., Karray, F., Armougom, F., Chifflet, S., Hirschler-Réa, A., Kharrat, H., Kamoun, L., Ben Hania, W., Olivier, B., Sayadi, S., Quéméneur, M. **(2017)**. Microbial diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment cultures associated with anaerobic biotransformation of coastal stockpiled phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Frontiers in Microbiology*, 8: 1583. doi: 10.3389/fmicb.2017.01583.

## - Chapitres d'ouvrages:

1) Souilem, S., El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., Sayadi, S., Galanakis, C.M. **(2017)**. Olive oil production sector: environmental effects and sustainability challenges. In: *Olive Mill Waste*, (Ed. Charis M. Galanakis). Oxford: Academic Press; p. 1-28.

## - Brevets nationaux d'invention:

**1)** Dorra Hentati, Sami Sayadi et Mohamed Chamkha. Biosurfactants de *Bacillus stratosphericus* : Production, caractérisation et potentialités biotechnologiques. Déposé le 22/11/2017.

## - Liste des thèses de doctorat es-sciences soutenues:

**1)** **Hanen Kharrat Chaari:** Valorisation du phosphogypse par production de sulfures par les bactéries sulfato-réductrices. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 29/06/2017.

**2)** **Alif Chebbi:** Isolement et caractérisation des bactéries dégradant des mercaptans et des hydrocarbures ; Production des biosurfactants et essais d'application. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 03/11/2017.

**3)** **Yosr Smaoui Daoud:** Détoxification et traitement-valorisation par voie anaérobie des lixiviats jeunes: Cas du CET d'Ageureb. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 18/11/2017.

**4)** **Amina Maalej:** Les composés phénoliques du fruit de l'olivier «*Oleaeuropea L.*»: Extraction, caractérisation. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 29/12/2017.

**5)** **Ahlem Jebali:** Optimization of microalgae cultivation and production on domestic wastewater and sea water: Investigation of valorization technologies. Thèse de doctorat en Génie Biologique, ENIS. Soutenue le 30/12/2017.

### *- Liste des Mastères soutenus:*

1) **Sonia Kechaou** : Utilisation des déchets solides pour la production des enzymes hydrolytiques: Approches méthodologiques. Mastère Professionnel, spécialité Sciences et Technologies de l'Environnement. Soutenu à l'ISBS le 12/10/2017.
2) **Ghada Kotti**: Récupération des antioxydants naturels à partir des margines et leurs applications en stabilité oxydative des huiles végétales. Mastère Professionnel, spécialité Technologie Alimentaire. Soutenu à l'ISBS le 10/11/2017.
3) **Rabeb Naimi**: Etude de l'élimination des polyphénols des margines par adsorption sur charbon actif commercial et sur biochar. Mastère de Recherche, spécialité Biotechnologie Microbienne. Soutenu à la FSS le 11/12/2017.
4) **Imen Halouani**: Isolement et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes, et étude de la biodégradation des hydrocarbures polyaromatiques. Mastère de Recherche, spécialité Biotechnologie Microbienne. Soutenu à la FSS, le 25/12/2017.

1) Journées LMI COSYS-Med, Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranéens, Hammamet, 6-8/11/2017.
2) 1st Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI), Sousse, 22-25/11/2017.

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» (Reconduction pour une nouvelle année).
2) Convention d'assistance de la société SEDD (Reconduction pour une nouvelle année).
3) Convention d'assistance de la société SOTULUB (Reconduction pour une nouvelle année).
4) Convention dans le cadre du Projet PRF intitulé : « Développement d'un éco-procédé pilote de culture de microalgues pour la séquestration du carbone, le traitement des eaux usées et la production de biocarburant »

- **Projet ERANETMED: PYRODIGEST:** ***2018-2021:*** Conversion of olive oil wastes through combined pyrolysis and anaerobic digestion: energy, value added product and eco-fertilizers production (Accepté en Décembre 2017).
- **Projet Tuniso-Euroméditerranéan:** ***2017-2020:*** **ERANETMED- BIOGASMENA**: Demonstartion of dry fermentation and optimization of biogastechnology for rural communities in the MENA region.
- **Projet USAID:** ***2017-2020:*** Partnerships for Enhanced Engagement in Research (PEER): Evaluation of algal treatment options for olive millwastewater to produce energy and biofertilizer.

- **Projet Tuniso-Japonais SATRPS:** ***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.
- **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.
- **Laboratoire Mixte International:** ***2014-2019*****:** LMI COSY-MED: Contaminants et écosystèmes marins sud méditerranéens.
- **Projet Tuniso-Marocain**: ***2017-2019:*** Procédé innovant pour le traitement des rejets de tannerie combinant des procédés biologiques et/ou physico-chimiques.
- **Projet bilatéral Tuniso-Belge (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.
- **Projet bilatéral Tuniso-Français (PHC-Utique géré par le CMCU):** ***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 bilatéral Tuniso-Français (PHC-Utique géré par le 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.

Le prix national de recherche scientifique et de technologie 2017 a été décerné au Prof. Sami Sayadi, Directeur du LBPE-CBS, par le Président de la République, lors d'une cérémonie tenue le 21 Juillet 2017 au palais de Carthage, à l'occasion de la journée du savoir.

## 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 |
| 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 Biologiques | CBS |
| Rania ABDELMAKSOUD-DAMAK | Docteur en Génie Biologique | CBS |
| Aref NEIFAR | Docteur en Génie Biologique | CBS et INSTM-Sfax |
| Yosra KAMOUN | Docteur en Sciences Biologiques | CBS |
| Ines BEN HMAD-KRID | Docteur en Génie Biologique | CBS |
| Naourez DAMAK-BOUJELBEN | Docteur en Génie Biologique | CBS |
| Ines BORGI | Docteur en Sciences Biologiques | CBS |
| Hajer TOUNSI | Docteur en Génie Biologique | CBS |
| Azza HADJ SASSI | Docteur en Génie Biologique | CBS |
| Hanen MALLEK | Docteur en Sciences Biologiques | 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 |
| Wafa MIHOUBI | Thèse (Sciences Biologiques) | FS BIZERTE |
| Emna KTATA | Thèse (Sciences Biologiques) | FSS |
| Amena SAADALLAH- KALLEL | Thèse (Sciences Biologiques) | ENIS |
| Mouna TRIKI | Thèse (Sciences Biologiques) | ENIS et I RC |
| Héla 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 |

## 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 : Essais d'identification moléculaire de la mutation CT1

Afin de déterminer la nature de la mutation responsable de la sur-expression des pectinases chez notre mutant CT1 de *Penicillium occitanis* et le gène qu'elle a touché, les ADN génomiques des deux souches sauvage (CL100) et mutante (CT1) de *Penicillium occitanis* ont été totalement séquencés. Les résultats de séquençage génomiques obtenus ont donné comme résultat 26 modifications entre ces deux souches, dont deux mutations non silencieuses, c'est-à-dire qui changent la séquence peptidique. Les autres changements sont probablement dus à des erreurs dans le séquençage, selon les conclusions de l'équipe espagnole qui a réalisé le séquençage. Le premier changement, T>A, a lieu dans une protéine portant un domaine fonctionnel « OB-fold nucleic acid binding domain » qui lui permet d'interagir avec un ADN simple brin ou un oligosaccharide (Flynn et Zou 2010). Ces domaines se retrouvent dans des proteins impliquées dans la réponse de la cellule aux endommagements de son ADN et jouent un rôle déterminant dans des interactions avec l'ADN, des assemblages de complexes protéiques ou encore dans la régulation des interactions protéine-protéine (Flynn et Zou 2010). La deuxième mutation a changé un G en C dans un facteur de régulation transcriptionnelle, comme attendu. Ce facteur possède un « Zinc-binuclear finger » Comprenany deux atomes de Zinc, coordonnés par six résidus Cystéines,

Dans une première partie du travail, nous avons transféré cette mutation chez une souche de *Fusarium oxysporum*. Pour atteindre cet objectif, il a fallu d'abord inactiver ce gène de régulation chez *F.oxysporum*, moyennant la méthode de « split marker recombination ». Ceci a permis d'avoir des transformants résistants à l'hygromycine et dont le gène codant pour le facteur de régulation « $C_6$ transcriptionnal factor » est inactivé ou disrupté par HygR. Les transformants obtenus ont servi pour évaluer l'impact de l'inactivation de ce gène d'intérêt sur l'expression des pectinases chez la souche transformée de *F. oxysporum* en quantifiant par RT-PCR et RT-Q-PCR ciblant les gènes codant pour différentes pectinases telles que les polygalacturonases (pga 1 à 10). Finalement, un test de pathogénicité de cette souche transformée sur les plantules de tomates a été effectué. Les résultats obtenus indiquent que l'inactivation de ce facteur de régulation chez *F. oxysporum* n'a pas d'effet significatif sur l'expression des pectinases. Nous avons par la suite réussi à intégrer le gène muté à la place du gène disrupté par HygR par co-transformation à l'aide d'un produit de PCR et d'un autre le fragment PCR codant pour la résistance à la phléomycine. Les mutants obtenus étaient donc sensibles à l'hygromycine et résistants à la phléomycine, et ont servi pour l'étude de l'effet de cette mutation chez *F. oxysporum*. Afin de répondre à la question essentielle, si cette mutation est bien responsable de la surexpression constitutive des pectinases chez *Penicillium occitanis* (« phénotype CT1»), nous avons commencé l'insertion de cette mutation chez la souche sauvage (CL100) de *P. occitanis* en suivant la même démarche appliquée chez *Fusarium* ; la première étape étant la disruption du gène candidat.

### Exploitation de la beta glucosidase de *Fusarium saolani* dans des réactions de synthèse de molécules à haute valeur ajoutée :

En plus de leur capacité hydrolytique, les β-glucosidases sont capables de réaliser des réactions de synthèse de biomolécules très recherchées dans divers industries. Les oligosaccharides comptent parmi ces biomolécules impliquées dans plusieurs fonctions biologiques et de nombreux processus pathologiques. La production d'oligosaccharides par synthèse chimique ou enzymatique offre de nouvelles perspectives dans la préparation de vaccins, de molécules thérapeutiques. Comparée aux autres enzymes, la β-glucosidase de *Fusaruim solani* nommée (FBgl1) est capable de réaliser des

réactions de synthèse d'oligosaccharides en présence de faible concentration de substrat (1g/l), alors que de fortes concentrations 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 de gentiobiose. L'analyse par chromatographie couche mince (CCM) montre que les oligosaccharides obtenus varient selon le substrat utilisé.
Les β-glucosidases sont capables de synthétiser aussi des alkylglucosides qui sont des tensioactifs non-ioniques. Ils sont de plus en plus demandés dans l'industrie de détergence. Ils sont des détergents biodégradables et antimicrobiens. Ils présentent une bonne stabilité chimique en présence d'eau et de solutions alcalines. La synthèse chimique des alkylglucosides est conditionnée par des températures et pression extrêmes, l'utilisation de catalyseurs toxiques et plusieurs étapes de protection, dé-protection et activation. D'où l'intérêt de la voie enzymatique qui est plus spécifique. La FBgl1 immobilisée est capable de synthétiser deux molécules d'alkylglucosides à 30°C à partir de cellobiose (1g/l) et de butanol.La forme libre de cette enzyme est incapable de réaliser cette bioconversion. Ce qui prouve que l'immobilisation à permis de mieux stabiliser l'enzyme en présence du solvant (le butanol). L'étude de l'effet de la concentration du solvant (le butanol) sur la synthèse des alkylglucosides montre que (15, 85) %(v,v) respectivement eau et butanol est la meilleure condition. L'analyse fine des deux molécules synthétisées est en cours.

### Optimisation de la production enzymatique pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique

La valorisation des ressources renouvelables est actuellement basée sur des procédés biotechnologiques peu coûteux et respectueux de l'environnement. Dans ce contexte nous avons envisagé la mise en œuvre de deux objectifs, le premier vise la valorisation des déchets agroindustriels comme des substrats pour la production des biocatalyseurs lignocellulolytiques par fermentation en milieu liquide et solide des champignons. Le second vise l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique par ces biocatalyseurs afin d'obtenir des sucres fermentescibles.
Dans un premier volet, nous avons réalisé des fermentations de la souche AX4 en milieu liquide (SmF). Nous avons optimisé les paramètres physico-chimiques afin d'améliorer la production des β-glucosidases. Le son de blé à 2% additionné du lactose (0,8%) est le meilleur substrat carboné pour la production des β-glucosidases (8,5 U/mL). Les meilleurs rendements de sécrétion d'enzymes ont été obtenus pour des rapports C/N inférieurs à 10 à pH7. Le jus enzymatique optimisé a été exploité dans l'hydrolyse des déchets de papier prétraités permettant d'obtenir des sucres à haute valeur ajoutée avec un rendement de saccharification élevé (94%).
Dans un deuxième volet, nous avons cherché à diminuer le coût de la production enzymatique au niveau de l'étape de la fermentation du champignon AX4 en milieu solide (SSF). Les conditions optimales des cultures de ce champignon trouvées sont : le son de blé (10 g) additionné de 0,8% du lactose comme source de carbone et un taux d'humidité de 85 % ce qui a conduit à une production maximale des deux activités β-glucosidaes (172,00±0,41 U/g) et xylanases (166,16±0,33 U/g).
Ce jus enzymatique optimisé sur milieu solide a été exploité dans l'hydrolyse des fibres d'alfa prétraitées ce qui a permis d'obtenir des sucres avec un rendement de saccharification élevé (83,2%). Ces rendements remarquablement élevés n'ont pas pu être obtenus qu'après avoir surmonté deux limitations majeures s'impliquant étroitement dans le phénomène d'hydrolyse. La première limitation est physique, elle consiste au transfert de masse, liée à l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides. La deuxième limitation est biochimique, elle est liée à l'absence de certaines enzymes (endoglucanase et cellobiohydrolases) dans le complexe enzymatique de cette souche.
Deux stratégies ont été réalisées pour surmonter ces deux limitations :

- Un prétraitement mécanique et chimique des substrats hydrolysables (déchets de papier et fibres d'alfa) ce qui a permis l'élimination de la lignine et une grande partie de l'hémicellulose donc, d'augmenter l'accessibilité des biocatalyseurs aux polysaccharides surtout la cellulose.
- L'utilisation d'un cocktail enzymatique formé par le jus de *T. thermophilus* additionné d'un jus enzymatique obtenu de *T. reesei* (Rut-C30) riche en endoglucanases et en cellobiohydrolases.

La combinaison des enzymes produites par AX4 et Rut- C30 est efficace pour améliorer le niveau de saccharification des déchets de papier. Cette combinaison a conduit à une libération de 18,2 g/L de sucres à partir de 20 g/L de déchets de papier prétraités. Cette combinaison enzymatique des deux

souches a entraîné aussi une libération importante de sucres (30,5±6,8 g/L) à partir des fibres d'alfa prétraitées (37 g/L). Les analyses spectroscopies FTIR et X-ray ont révélé la structure holocellulosique des fibres d'alfa pendant le prétraitement alcalin et l'hydrolyse enzymatique. Les différences structurelles de ces fibres observées entre celles traitées chimiquement et celles enzymatiquement sont liées à leurs conditions d'hydrolyse et à l'efficacité enzymatique.

### Impact du prétraitement alcalin sur l'hydrolyse enzymatique des fibres d'alfa par le cocktail enzymatique

Cette étude vise à valoriser une plante herbacée très abondante en Tunisie : l'Alfa (*Stipa tenacissima*). Les fibres d'alfa riche en lignocellulose est une bonne matière première pour la production de bioéthanol après conversion de la cellulose en sucres fermentescibles. L'accent principal de la présente recherche est de déterminer les conditions optimales de la saccharification enzymatique de l'alfa en utilisant les β-glucosidases et les xylanases produites par *T. thermophilus* cultivée en fermentation solide sur son de blé et lactose, ainsi que les cellulases qui sont produites par le mutant RutC30 de *T. reesei*. La combinaison des jus enzymatiques de *T. thermophilus* avec les cellulases de *T. reesei*, entraînent une productivité élevée de sucres et un rendement de saccharification maximal de 83,2%. Le Cocktail enzymatique efficace hydrolyse les fibres d'alfa prétraitées de 3,7%, ce qui montre une obtention d'une concentration élevé en sucres réducteurs de 30,5 ± 6,8 g /L (principalement du glucose et du xylose) dans les hydrolysats. En utilisant les spectroscopies FTIR et X-Ray, nous avons remarqué des changements de la structure holocellulosique des fibres d'alfa pendant le prétraitement alcalin et l'hydrolyse enzymatique. Les différences structurelles observées entre le traitement chimique et enzymatique sont liées à leur hydrolysabilité et l'efficacité enzymatique.

### Extraction enzymatique des fibres d'Alfa et comportement des Bio-composites PLA / ALFA

Ce Travail concerne le développement d'une méthode respectueuse de l'environnement pour l'extraction des fibres d'Alfa en adoptant un traitement enzymatique pour le développement de biocomposites à base de PLA (poly lactate). Des traitements alcalins (0,4M) et enzymatiques (pectinases et xylanases) ont été utilisés pour une séparation des fibres de halfa. L'efficacité des traitements (morphologiques, compositions, stabilité de surface et thermique) a été étudiée par MEB, FTIR, analyse biochimique et TGA (thermal gravimetric analysis). Les traitements enzymatiques ont permis une amélioration des surfaces des fibres par l'élimination de la lignine, de la pectine et des hémicelluloses et ont augmenté les niveaux de défibrillation. Plus intéressant, la stabilité thermique des fibres d'alfa traitées par les enzymes a été améliorée. Les biocomposites PLA / alfa ont été formulés par extrusion et moulage par injection avec 20% en poids des fibres. Les résultats d'essais mécaniques (traction et flexion), d'impact et d'absorption d'humidité sur des biocomposites ont révélé une augmentation significative de la résistance mécanique, de la ténacité, de la résistance à la traction et de l'humidité pour les fibres de alfa / PLA traités par les enzymes. L'analyse TGA a révélé une bonne stabilité thermique et une bonne compatibilité des biocomposites par l'élimination des composants de faible résistance dans les fibres traitées.

### L'activité galactolipase de la lipase TTL de *Talaromyces thermophilus* : nouvelle alternative pour la bioénergie

Ce travail se situe dans le cadre de l'investigation biochimique et moléculaire d'une Galacto-Phospho-Lipase fongique de *Talaromyces thermophilus*.
Les lipases microbiennes constituent des enzymes qui possèdent un large spectre d'action sur divers substrats et sont par conséquent utiles pour de nombreuses applications biotechnologiques et industrielles. Les activités lipase et phospholipase de ces enzymes ont été bien caractérisées, cependant, leur action sur les galactolipides est beaucoup moins étudiée. Dans la perspective de la progression de l'oléochimie et de la chimie verte, d'importants efforts de recherche sont aujourd'hui consacrés au développement de sources de lipides alternatives des huiles végétales dont l'utilisation pourrait conduire à une sévère restriction des huiles destinées à l'alimentation humaine. Dans ce contexte, les microalgues, les bactéries ou les levures oléagineuses sont encours d'exploitation, mais les coûts de production restent élevés.

L'exploitation des galactolipides contenus dans la biomasse végétale ou les déchets verts de l'agriculture serait une alternative intéressante. Cependant, contrairement aux triglycérides qui peuvent être obtenus par simple pression de graines ou de fruits oléagineux, il est difficile d'extraire ces galactolipides dispersés dans la biomasse. La découverte et la caractérisation biochimique et structurale de nouvelles enzymes possédant une activité galactolipase permet donc d'envisager de nouvelles approches pour accéder à ces lipides, soit pour libérer leurs acides gras par des réactions d'hydrolyse; soit pour synthétiser de nouveaux esters par des réactions de transfert d'acyle *in situ*.
*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 (Belhaj et al., 2010, Belhaj et al., 2012). L'hypothèse que cette lipase pourrait avoir une activité galactolipase a pu être avancée. Les derniers travaux réalisés dans l'EIPL ont montré que la TTL exerce, en plus de son activité lipase et phospholipase, une activité galactolipase très intéressante sur des substrats galactolipidiques monogalactosyldiglycéride en C8 (diC8-MGDG) et digalactosyldiglycéride en C8 (diC8-MGDG). Cette activité est la plus élevée dans 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. 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-Dgalactopyranosyl-sn-glycérol] et C12-DGDG [1,2-di-Ododecanoyl-3-O- (6-O-α-D-galactopyrannosyl-β-D-galactopyranosyl-sn-glycérol]. Le docking de chaînes moyennes de triglycérides, de MGDG et de DGDG dans le site actif de TTL révèle des solutions structurales dont les affinités sont en accord avec les données in vitro.
Nous avons aussi mis au point un dosage spectrophotométrique spécifique de l'activité galactolipase en utilisant pour la première fois un substrat galactolipidique synthétisé à partir de l'acide α-éléostéarique (extrait à partir de l'huile de tung où il représente environ 70% des acides gras totaux), ce substrat est le 1,2-di-α-éléostéaroyl 3-galactopyranosyl glycerol (αE-MGDG). En effet, c'est le triène présent dans cet acide gras qui confère de fortes propriétés d'absorption UV (Belhaj et al, article soumis).

Dans un second temps, et dans le cadre d'adapter cette gatactolipase à des procédés industriels de biotransformations (Trans-étérifications) de la biomasse végétale, nous envisagerons d'améliorer sa stabilité vis-à-vis des solvants organiques par mutagenèse. Nous avons développé en premier lieu un système d'expression hétérologue de la TTL chez *S. cerevisiae*. Le cDNA codant pour la TTL a été synthétisé et cloné dans le vecteur pGEM-T, puis dans le vecteur d'expression pDP. L'insertion de l'insert dans la bonne orientation a été vérifiée par séquençage et par digestion enzymatique. L'un des clones recombinants a été utilisé pour la transformation de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B. Les clones de levure recombinants ont été cultivés sur milieu minimum liquide contenant le glucose jusqu'à la phase stationnaire puis transférés dans un nouveau milieu contenant 2% de galactose (comme substrat inducteur). Une activité lipolytique a été détectée avec un maximum de 292.5 U/ml atteint après 48 heures d'induction. En comparant les cinétiques de croissance des levures recombinantes et de la souche sauvage de *S. cerevisiae*, aucun retard de croissance n'a été observé, ceci a été confirmé par la technique des gouttes sur milieu solides. Ce qui suggère que la TTL exprimée n'a pas un effet toxique ou inhibiteur sur la croissance de la levure. La purification de la TTL recombinante sur résine fixant le Ni est en cour de réalisation.

## **Projet 2 :** Exploitation et Amélioration des champignons Oléagineuses

L'utilisation des microorganismes oléagineux pour la production des lipides d'intérêt est une alternative prometteuse de point de vue biotechnologique. En effet, les huiles microbiennes constituent une source importante d'approvisionnement en lipides et acides gras de haute valeur ajoutée pouvant remplacer de nombreux composés issus de la pétrochimie. Les lipides microbiens sont constitués habituellement de 80-90% de triglycérides (TAG) et ont une composition en acides gras similaire à celle des huiles végétales. Les organismes qui stockent plus que 20% de lipides sont considérés comme oléagineux. Ils peuvent appartenir aussi bien à des espèces bactériennes qu'à des eucaryotes. L'utilisation des microorganismes oléagineux pour la production des lipides d'intérêt est une

alternative prometteuse de point de vue biotechnologique. Néanmoins, le coût élevé de leurs productions 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. D'autre part, la recherche de nouvelles souches plus performantes (hyper-productrices et résistantes aux conditions de stress) tout en combinant l'approche microbiologique et génétique conduira à des procèdes rentables économiquement.

## 1. Production simultanée de triglycérides et de polyols esters d'acides gras par une levure oléagineuse : Caractérisation structurale et intérêt biotechnologique

Les levures oléagineuses sont d'une grande importance grâce à leur capacité de produire des lipides microbiens d'intérêt biotechnologique croissant. La souche Y-SL7 est une levure à caractère oléagineux récemment isolée au laboratoire. L'identification moléculaire de cette souche montre qu'il s'agit de la levure *Rhodotorula babjevae*. La cinétique de production de lipides par la souche Y-SL7 sur un milieu d'accumulation, révèle qu'un maximum d'accumulation de lipide est atteint au bout de 144 h. En parallèle, un élément à caractère lipidique est secrété dans le milieu de croissance. Cette production double est un comportement rarement observé chez les levures oléagineuses. Afin de mieux comprendre cette dualité, nous avons étudié les facteurs (conditions de culture et composition du milieu de production) conduisant à un tel comportement. La culture contrôlée dans un fermenteur de 7 L a conduit à une amélioration de l'ordre de 35% dans le taux des lipides secrétés. La chromatographie sur couche mince des lipides (intra et extra) secrétés par la souche Y-SL7 montre que les deux fractions sont d'une structure différente. Afin de déterminer la composition structurale du lipide secrété par la souche Y-SL7, une série de méthodes analytiques (FTIR, HPLC, GC/MS et LC/MS) a été adoptée. Cette étude a montré que la fraction secrétée, appartient à la famille des glycolipides, est d'une structure atypique et rarement décrite dans la littérature. Il s'agit d'un mélange de polyols (arabitol ou mannitol) estérifiés à un acide gras (un C18:0 ou un C16:0) acétylé en position 3. Les glycolipides (molécules amphiphiles) sont actuellement à l'origine de plusieurs applications biotechnologiques et constituent un domaine de recherche en voie d'émergence. La production des glycolipides microbiens à partir des sources renouvelables présente un grand intérêt économique et écologique. En effet, ces molécules sont connues pour leurs activités biologiques prometteuses et de leurs caractéristiques de tensioactifs par rapport aux tensioactifs dérivés du pétrole. Le glycolipide secrété par la souche Y-SL7 est doté d'une activité biosurfactante et émulsifiante suite au test de déplacement d'huile et de la mesure d'indice d'émulsification. Via le test MTT, ce nouveau glycolipide a montré un effet cytotoxique, prometteur au plan thérapeutique, sur des lignées cellulaires cancéreuses telles que MCF7, HepG-2, Hep-2 et Hek-293.

## 2. Exploitation du potentiel hydrolytique chez des levures oléagineuses nouvellement isolées

Le criblage de 205 souches de levures nous a permis d'isoler 12 nouvelles souches de levures oléagineuses. L'identification moléculaire de ces souches (ayant une teneur en lipide plus que 20% de leurs matières sèches) a montré qu'il s'agit de levures appartenant aux genres *Rhodotorula, Naganishia, Yarrowia, Candida, Tricosporonet Cyberlindera.* L'étude par GC/MS montre une ressemblance au niveau de la composition acidique des lipides des 12 souches (richesse en C18:1 suivie par C16:0). En plus de leur pouvoir oléagineux, nous avons exploité leur potentiel hydrolytique tel que l'activité lipase, CMCase et β-glucosidase et ce, par étude qualitative et quantitative. Trois souches sont productrices d'activité CMCase et β-glucosidase avec un maximum de 0.11 U/mL et 0.55 U/mL respectivement chez *Trichosporon asahii*. L'étude de l'activité lipase montre que six souches produisent une lipase extracellulaire avec un maximum de 50 U/mL chez la souche *Yarrowia lipolytica* D1P. D'autre part, nous avons montré l'intérêt de deux types de déchets, le son de blé et la pâte de neutralisation de l'huile de grignon d'olive (PNHG), dans la production de lipides microbiens. Une étape d'hydrolyse à l'acide dilué s'est avérée nécessaire pour libérer le maximum de sucre à partir du déchet lignocellulosique avant fermentation. La souche MG1 a montré le pouvoir de croître sur l'hydrolysat du son de blé non détoxifié en produisant 2.1 g/L de lipides. D'autre part la PNHG a servi à la production de lipide microbien et en même temps à la production d'enzymes lipolytiques. La souche *Yarrowia lipolytica* D1P a produit le maximum de lipide et d'activité lipase de l'ordre de 4.35 g/L et 174.1 U/mL respectivement. L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt que porte l'utilisation

des levures oléagineuses non seulement dans la production de lipides de réserves mais aussi dans la synthèse des métabolites de haute valeur ajoutée.

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

### Les lipides fongiques

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la production des lipides d'intérêt chez les champignons filamenteux oléagineux. Dans des travaux antérieurs, une optimisation de meilleures conditions d'accumulations des lipides par deux souches fongiques CO8 (*Mucor circinelloides*) et E4-2 (*Fusarium verticillioides*) a été réalisée. L'évaluation de la qualité des lipides produits par la souche d'E4-2 pour la production de biodiesel a été étudiée en comparant avec les normes standards. Les résultats montrent que les lipides de la souche E4-2 sont respectueux de ces normes.

Dans la suite de ses travaux, nous avons commencé à appliquer l'approche de génie génétique par la construction des mutants qui surexpriment les gènes responsables de la biosynthèse des lipides ou qui sont inactivés dans les gènes de dégradation des acylglycérols, pour améliorer la quantité des lipides accumulés par la souche E4-2. Pour ce faire, une cassette de délétion du gène Gut2, constituée de deux fragments chevauchants dont l'un porte 1 kb de la partie promotrice du gène Gut2 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, a été préparée. Cette cassette a été utilisée pour transformer la souche E4-2 afin de remplacer le gène endogène par le gène de résistance à l'hygromycine. La vérification des transformants obtenus est en cours de réalisation.

D'un autre côté, nous envisageons de sur-exprimer le gène codant pour le transporteur mitochondrial du malate (mMT). Nous avons choisi de cloner la région codante du gène mMT de part et d'autre du promoteur et du terminateur du gène codant pour Zrt1 (zinc transporter protein). Cette construction servira par la suite pour transformer la souche E4-2.

### Les pigments d'origine fongique

Les pigments intra et extracellulaires produits par la souche E4-2, extraits par macération, ont été testés sur différentes lignées cellulaires. L'extrait intracellulaire donne une mortalité des cellules MCF7, Hela et Hepg2 à des IC 50 égales à 75 µg/ml, 118 µg/ml et 183 µg/ml, respectivement. L'extrait extracellulaire donne une mortalité cellulaire avec des IC50 de 42 µg/ml pour MCF7 et 84 µg/ml pour Hepg2.

La séparation des différents constituants de l'extrait par chromatographie en couche mince a permet d'obtenir 7 fractions dont les effets sur les cellules MCF7 a été effectué. La fraction 7 est la plus toxique. Dans la suite du travail, nous envisageons de réaliser d'autres analyses pour la caractérisation du colorant produit par la souche E4-2 et pour l'identification de la cause de la mortalité des lignées cellulaires par les produits testés

### Spectre d'hôte du champignon insecticide *Beauveria bassiana*

Une souche locale de *Beauveria bassiana* (P2) hyperproductrice de protéase et de chitinase a déjà montré un pouvoir insecticide puissant sur la mineuse de tomate *Tuta absoluta.* Une optimisation de la production en masse des spores de ce champignon est en cours dans le but de formuler un bio-insecticide. Ainsi et en utilisant la fermentation semi solide, le son de blé, le son d'orge, le riz et l'écorce de soja se sont avérés de bons substrats. Une forte adhérence des spores de P2 à ces substrats empêche une quantification minutieuse des résultats. Les solutions qui sont en cours d'étude sont l'ajout d'additifs (huile, détergents…) ou bien le séchage du milieu, suivi d'un broyage pour obtenir une poudre insecticide. Une solution aqueuse à base des spores de P2 a été utilisée sur différents parasites nuisibles à l'agriculture en Tunisie et l'évaluation des résultats est en cours. Une optimisation plus poussé de la production en masse des spores de P2 sera effectuée en parallèle pour évaluer le coût final du bioinsecticide.

Le séquençage du génome de P2 a été effectué et l'analyse préliminaire a montré la présence du gène de protéase *sbp*, isolé dans des travaux antérieurs. Il n'existe pas d'autre gène homologue à *sbp*. Une analyse approfondie est en cours pour chercher d'autres gènes codant pour des protéines insecticides,

comme les chitinases. Le séquençage du génome de la souche sauvage P1 avait été réalisé mais devrait être refait afin de couvrir tout le génome. Le but étant de trouver la ou les différences entre les deux souches P1 et P2.

### Production du peptide cationique AcAFP secrété par *Aspergillus clavatus* chez *Pichia pastoris*.

Dans le but de conduire une étude structure-fonction comparative entre les formes natives et des formes mutées du peptide AcAFP sécrété par *Aspergillus clavatus*, que nous nous proposons de produire, nous nous sommes intéressés à l'expression hétérologue dans un système eucaryote (*P.pastoris*). Nous conduisons l'expression des deux formes peptidiques dérivées de l'AcAFP, la forme mature de 154 pb et la forme large (forme mature additionnée de six acides aminés : DESAVQ) de 172 pb, dans la levure méthylotrophe *Pichia pastoris* et en utilisant le vecteur pPICZαC contenant un promoteur fort inductible par le méthanol. Ce système d'expression est particulièrement intéressant vu la possibilité de sécrétion efficace des protéines recombinantes qu'il présente, ainsi que sa capacité à réaliser des modifications post-traductionnelles caractéristiques des eucaryotes. Ces travaux nous permettront de choisir le système d'expression le plus performant pour la production du peptide AcAFP recombinant en grande quantité, avec une facilité de purification tout en gardant une activité antifongique assez importante contre le phytopathogène *Fusarium oxysporum*.

Nous avons commencé par cloner les cDNA des deux formes : la forme large et la forme mature de l'AcAFP dans le vecteur de clonage pGEM-t easy et par les séquencer afin de s'assurer de l'absence d'erreurs dues à la Taq DNA polymérase. Par la suite, les constructions recombinantes ont subi une double digestion par les deux enzymes de restriction ClaI et XbaI afin de pouvoir libérer les inserts correspondant au cDNA des trois formes peptidiques du gène acafp. Ces inserts obtenus ont été purifiés et introduits dans le vecteur d'expression pPICZαC préalablement digéré (Xba I et ClaI) et déphosphorylé. Les plasmides recombinants obtenus ont servi par la suite pour la transformation de la souche Top10 *d'E.coli*. Deux clones recombinants hébergeant respectivement le gène acafp forme mature et la forme large dans le vecteur d'expression pPICZαC sont retenus. En attendant les résultats de séquençage des deux clones sélectionnés, nous entamerons la transformation des deux souches de *Pichia pastoris* ; X33 *(Mut+)* et KM71 (*Mut*-). Une fois nous aurons mis au point et identifié le meilleur système d'expression de notre peptide, nous envisageons la production des mutants structuraux obtenus par mutagénèse par expression de gènes synthétiques dans le cadre de l'étude des relations structure-fonction. Ceci afin de relier la variabilité de la séquence et/ou structure avec l'activité antifongique nouvellement exprimée. Il est aussi envisagé de faire la synthèse de peptides dérivant du peptide originel et tester leurs activités antifongiques.

### 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*. 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. 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 tels que l'actinomycine D, le gentamycine et le

chloramphénicol est en cours de réalisation. Dans un deuxième temps, nous avons commencé l'exploration d'autres pistes d'investigation, autres que la résistance/sensibilité aux antifongiques à savoir l'effet des acides faibles (acide sorbique, acide ascorbique…), l'osmosensibilité (NaCl, KCl et sorbitol) et la voie d'oxydoréduction ($H_2O_2$). Les résultats des tests préliminaires réalisés sur plaque en présence de $H_2O_2$ montrent vraisemblablement une différence de viabilité entre la souche sauvage et les mutants dépourvus du gène PoDr1. En effet, le pourcentage de viabilité est de 54, 15 et 1% pour la souche sauvage cultivée en présence de 10, 30 et 50 µg/ml de $H_2O_2$ respectivement alors que chez les mutants, ces mêmes concentrations en $H_2O_2$ donnent des pourcentage de viabilité plus faibles (35, 10 et 0). Ce résultat doit être confirmé par des tests sur boite et des cultures liquides.

Dans un autre volet du travail, l'application du système CRISPR-Cas9 a été entamée. En effet, des plasmides portant le gène codant pour la nucléase Cas9 ont été aimablement fournis de la part d'une équipe du Danemark. La construction renfermant la sgRNA spécifique du gène PoDr1 a été par la suite préparée et a servi pour la co-transformation (avec le plasmide portant le marqueur de résistance à l'hygromycine et le gène de la nucléase Cas9) de la souche sauvage. La vérification des transformants obtenus est en cours de réalisation.

## **Projet 3 :**Etudes et Expression hétérologue de gènes eucaryotes impliqués dans le cancer et les maladies génétiques

Au cours de cette année, une attention particulière est accordée à l'étiologie virale de le cancer du nasopharynx en raison de son association constante au virus d'Epstein Barr (EBV) et éventuellement à une co-infection par le virus du papillome humain (HPV).

L'implication de l'EBV dans la dérégulation du programme épigénétique a été proposée par certains travaux qui ont montré des fréquences de méthylation significativement plus importantes dans les tumeurs $EBV^+$, en comparaison avec les $EBV^-$ (casdes carcinomes gastriques, des lymphomes Hodgkiniens et des cancers de la tête et du cou). De même, par des approches de surexpression et d'inhibition, d'autres travaux ont montré l'effet de la protéine virale LMP1 sur la surexpression des enzymes DNA méthyl-transférases (DNMTs) et la méthylation aberrante de certains GST (gènes suppresseurs de tumeurs), notamment la protéine transmembranaire intervenant dans l'adhésion des cellules épithéliales, E-cadhérine. A la lumière de ces données, nous nous sommes intéressé à identifier d'autres régions d'ADN dérégulées épi-génétiquement suite à l'expression de l'oncoprotéine virale LMP1. Ce travail est basé sur l'analyse comparative des profils de méthylation générés par *Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed- PCR* entre des cellules exprimant LMP1 et des cellules témoins. En effet, notre analyse a permis de révéler plusieurs régions d'ADN différentiellement méthylées dans trois contextes cellulaires NP69, Hela et BJAB. Nos résultats supportent ainsi le rôle de l'oncoprotéine virale LMP1 dans la dérégulation du programme épigénétique. Il s'agit principalement de trois séquences riches en di-nucléotide CG localisées, respectivement, au niveau des gènes Septin 7, NUDT21 et ZNF189. Les deux premiers gènes sont qualifiés comme GST et par conséquent, nous envisagerons de continuer notre exploration fonctionnelle afin de dévoiler un nouvel aspect de l'oncogenèse du NPC en relation avec l'infection latente à l'EBV.

Par ailleurs, les tumeurs NPC définies par leur association constante au virus d'Epstein-Barr (EBV) pourraient être également le siège d'une 2$^{ème}$ infection virale par le HPV. En effet, mondialement, la proportion de HPV est estimée de 20 jusqu'à 51% dans les cas de NPC. Les génotypes HPV les plus rencontrés, HPV16 et 18, sont à haut risque oncogène. Bien que la présence de HPV et EBV soit notée dans la plupart de ces études, le rôle éventuel de cette coïnfection dans les cellules du nasopharynx reste encore à déterminer. Dans ce cadre, en collaboration avec nos partenaires cliniciens du CHU de Sfax, nous nous sommes intéressé à explorer au plan moléculaire cette nouvelle entité pathogénique des NPC associés au virus HPV, qui reste encore indéfinie en Tunisie et même en Afrique. En effet, notre analyse par PCR-Southen blot a montré la présence de l'ADN HPV dans 8 parmi 75 cas NPC testés, soit (10.6 %). Le génotype à haut risque oncogène HPV était détecté dans 5 cas et le génotype à bas risque HPV11 dans un seul cas. Pour les deux autres cas positifs, le génotype HPV reste encore non identifié. De même, la recherche de l'ADN EBV a montré la présence de ce virus dans 71/75 cas, soit 94%. Ce travail sera achevé par l'étude de corrélation entre HPV et les paramètres clinico-pathologiques et la recherche de la surexpression de p16 afin vérifier le rôle fonctionnel de cette infection par HPV dans le développement de NPC.

## Etude Moléculaire par séquençage nouvelle génération (NGS) des gènes responsables du cancer de sein héréditaire au Sud Tunisien

En Tunisie, comme dans la grande majorité des pays du monde, le cancer du sein est le premier cancer féminin. Son incidence standardisée a été estimée à 24,3 pour 100000 femmes entre 1993-1997. Il se caractérise par sa survenue relativement fréquente chez la femme jeune. Ce cancer peut être héréditaire ou sporadique. Plusieurs facteurs de risque sont impliqués: les facteurs hormonaux, héréditaires, environnementaux et alimentaires. Des études de liaison génétique dans certaines familles à haut risque de cancer du sein ont identifié 2 gènes majeurs, BRCA1 et BRCA2, localisés respectivement sur les chromosomes 17q21 et 13q12-13. Cependant, des études épidémiologiques ont montré que des mutations délétères dans ces gènes sont relativement rares dans la population générale. Les mutations constitutionnelles au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2 peuvent justifier ensemble 2 à 3 % de tous les cancers du sein et aux environ 30 à 40% de tous les cancers héréditaires qui constituent 5 à 10% de l'ensemble des cancers du sein. En Tunisie, les mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 sont impliquées dans 19,4 % des cancers du sein héréditaires.
D'autres cancers ont été associés à des mutations dans les gènes *BRCA1* ou *BRCA2*, tels que le cancer de l'ovaire, le cancer du pancréas et le cancer de la prostate.
Plusieurs autres études ont montré que les mutations délétères peuvent aussi toucher des gènes de prédisposition mineurs qui peuvent être impliqués dans le cancer de sein héréditaire tel que : P53, PALB2, CDH-1,..
Le séquençage nouvelle génération (*NGS: Next Generation Sequencing*) constitue une révolution biotechnologique de ces dernières années, en permettant de séquencer de grandes quantités d'ADN en des temps records. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude Moléculaire par séquençage nouvelle génération (NGS) des gènes responsables du cancer de sein héréditaire au Sud Tunisien. Dans un premier volet, nous avons commencé par le recrutement des familles présentant un risque élevé de cancer de sein héréditaire. Plusieurs critères de sélection ont été établis :

**A.** Plusieurs cas de cancer du sein (en particulier lorsque le diagnostic s'est produit à ≤50 ans) et / ou de cancer de l'ovaire associés ou pas à des cancers de la prostate ou du pancréas. En particulier dans des parents étroitement apparentés, du même côté de la famille
**B.** Cancer du sein et de l'ovaire chez la même femme.
**C.** Cancer du sein à moins de 35 ans.
**D.** Cancer du sein chez l'homme.

Le choix de famille sera orienté par les critères sus-jacents. L'inclusion finale sera faite pour un score d'Eisinger ≥6,

Un arbre généalogique pour chaque famille a été bien établi suite à un questionnaire et un consentement éclairé. Par la suite, nous avons effectué la collecte des échantillons de sang provenant des cas index atteints de cancer de sein héréditaire de chaque famille. Ensuite, l'extraction d'ADN à partir des échantillons collectés a été faite par le Kit « QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) ».

Dans un second volet de ce travail, nous avons eu recours au séquencage de ces différents échantillons par NGS en utilisant le séquenceur MiSeq Illumina et les kits« QIAseq 12-index I (48) » et « Human BRCA1 and BRCA2 plus Panel » contenant les gènes de prédisposition majeures (BRCA1, BRCA2) et mineures (P53, PALB2, PTEN et CDH1). En effet, la technologie NGS repose sur 3 étapes : la préparation de banques en utilisant une fragmentation aléatoire de l'ADN suivie de la liaison avec des petites séquences spécifiques, L'amplification et le séquençage. L'interprétation des résultats a été faite en se référant au logiciel retrouvé sur le site officiel de Qiagen (Analysis Data Center). Plusieurs variations nucléotidiques ont été identifiées notamment les mutations délétères : sur 20 familles testées, nous avons trouvé 5 mutations délétères qui touchent 6 familles différentes. Ces mutations touchent aussi bien les exons 11 et 17 du gène BRCA1 que les exons 2, 10 et 23 du gène BRCA2. Le criblage des autres membres des 6 familles, présentant les différentes mutations et la confirmation par séquençage capillaire, est en cours de réalisation.

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

Les tumeurs décrites comme des « blessures qui ne se referment jamais » ont perdu le juste équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs, cet équilibre sépare deux phases de développement tumoral. Dans la première phase dite pré-invasive, une tumeur maligne ne peut pas dépasser 1 à 2 millimètres de diamètre si elle n'est pas vascularisée. Cette masse tumorale oscille entre prolifération et apoptose. Dans la deuxième phase, les cellules tumorales ont secrété des facteurs pro-angiogéniques afin d'induire la vascularisation tumorale.

Un lien étroit entre les formes 121 et 165 du VEGF-A et l'angiogenèse tumorale a été établi. Les thérapies anti-angiogéniques, par la preuve de leur efficacité avec le développement de molécules inhibitrices de l'axe VEGF/VEGFR, occupent actuellement une place importante dans l'arsenal thérapeutique essentiellement dans des conditions métastatiques. 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. 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 chez *E. coli*. En effet, les conditions de production sont optimisées pour obtenir de meilleurs rendements en protéine recombinante soluble. 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 néoformation des vaisseaux en mode *ex vivo*. Cette protéine recombinante est par la suite utilisée pour identifier 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. Les peptides majoritaires sont déjà synthétisés. Des tests additionnels d'ELISA sur la protéine $VEGF_{165}$ seront effectués avec les peptides après synthèse afin de pouvoir valider leur spécificité. La force d'interaction/l'affinité des peptides avec la $VEGF_{165}$ peut être vérifiée par Biacore. Bien entendu, des tests fonctionnels, *invitro* en utilisant les cellules endothéliales, *ex vivo* avec le modèle CAM et *in vivo* sur des animaux sains ou atteints de cancer, seront à même de répondre si nos peptides ont une action réelle sur le blocage du VEGF et son impact sur l'angiogenèse. D'autres expériences de *Phage Display* seront effectuées sur la protéine recombinante $VEGF_{121}$ pour identifier des anti-$VEGF_{121}$ et générer, avec les anti-$VEGF_{165}$ déjà identifiés, des peptides de fusion ciblant à la fois les deux formes majoritaires du VEGF (121 et 165) pour cibler d'avantage l'angiogenèse.

### Molécules à potentialités thrombotique et anti-thrombotique :

Bien que les plaquettes soient des acteurs clefs de l'hémostase physiologique, elles sont aussi impliquées dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires qui représentent la première cause de décès dans le monde. La fréquence de ces maladies ne cesse d'augmenter.

Les patients sont traités par des antiagrégants plaquettaires pour prévenir le risque d'obturation des vaisseaux sanguins par thrombose. Néanmoins, ces médicaments peuvent présenter plusieurs effets secondaires tels que les troubles gastro-intestinaux, les saignements et l'hypotension. La résistance vis-à-vis de ces molécules représente, elle aussi, une limite majeure car elle peut entraîner la survenue d'un événement cardiovasculaire pour des patients sous traitement.

D'autre part, les agonistes favorisant l'agrégation sont utilisés *in vitro* lors des explorations fonctionnelles de l'hémostase et sont d'une importance cruciale pour mieux décortiquer ce mécanisme. Ce projet vise l'identification de molécules à potentialités thrombotiques ou anti-thrombotiques. Les travaux ont été déjà initiés dans notre laboratoire, en collaboration avec la faculté de médecine de

Sfax. Nous avons criblé, grâce à un agrégomètre et sur le plasma riche en plaquettes humain (PRP), un ensemble de molécules synthétisées par voie chimique et commercialisées. Nous avons identifié quelques molécules à pouvoir anti-agrégant et une molécule pro-agrégante.

Les résultats de cytotoxicité de ces molécules d'intérêt étaient encourageants pour entamer leur exploration fonctionnelle et essayer de décortiquer leur mode d'action. Nous avons commencé par l'exploration de la molécule pro-agrégante notée LG. Nous avons réalisé des tests d'agrégomètrie sur des plaquettes humaines lavées, en présence de notre molécules seule et à différentes concentrations, pour voir l'évolution de l'effet agrégant en fonction de la dose ajoutée. Nous avons réalisé aussi des tests d'agrégomètrie en présence de faible dose de LG, additionnée de faible dose de collagène ou de TRAP afin de tester la possibilité de potentialisation entre deux molécules différentes. Un enregistrement par vidéo-microscopie de la formation d'un thrombus, sur une surface thrombogénique, a été réalisé suite au traitement, par le LG, du sang humain marqué par le DIOC afin de confirmer qu'il s'agit bien d'une agrégation et de définir la taille du thrombus formé.

L'effet de la molécule LG sur la sécrétion plaquettaire a été testé par cytométrie en flux en quantifiant les protéines CD62 et CD63 à la surface des plaquettes. Ceci nous a permis de conclure que notre molécule d'intérêt stimule la sécrétion aussi bien des granules a que les granules denses ce qui entraine une agrégation irréversible. Le marquage des plaquettes par l'anticorps PAC-1 a montré que le LG entraine l'activation du complexe GPIIb-IIIa, ce dernier est un élément clef pour l'agrégation plaquettaire puisqu'il fixe le fibrinogène assurant le pontage entre les plaquettes.

Afin de décortiquer la voie de signalisation impliquée dans le pouvoir pro-agrégant de notre molécule, une cinétique a été réalisée sur les plaquettes traitées par le LG au cours de laquelle, nous avons suivi, par western-blot, l'évolution au cours du temps de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans différentes voies de signalisation. Nous avons aussi suivi l'évolution du flux calcique chez les plaquettes traitées par notre molécule et nous avons montré qu'elle entraine une augmentation de la concentration intra-cytoplasmique du calcium. Ceci étant impliqué dans le mécanisme provoquant l'agrégation plaquettaire induite par le LG puisqu'en « chélatant » ce calcium, le pouvoir agrégant de notre molécule est perdu.

Une partie de ce travail a été réalisé en collaboration avec l'institut des maladies métaboliques

### Etudes sur l'apoptose médiée par la surexpression de p53 chez *Saccharomyces cerevisiae :* Application de la technique FTIR

Afin de développer de nouvelles technologies utiles dans la mise en évidence de l'apoptose, nous avons pensé à appliquer la technique de spectroscopie infrarouge transformée de fourrier IRTF. Cette technique est une méthode simple à mettre en œuvre et non destructive ne nécessitant pas l'utilisation de marqueurs spécifiques et permet de détecter les variations minimes de la physiologie moléculaire. Au cours de deux stages menés dans un laboratoire Français spécialisé dans cette technique à l'IUT de Caen, nous avons pu maîtriser et exploiter cette nouvelle technologie en mettant en exergue des différences notables entre des cellules contrôles et des cellules p53+ ainsi que des mêmes cellules traitées par la molécule de Nigelle. Nous avons montré que la fragmentation de l'ADN chez les cellules P53+ se traduit par la diminution des intensités de certaines bandes. Nous avons également montré le désordre membranaire par l'augmentation d'autres bandes. La même technique FTIR a permis de mettre en évidence l'action préventive de la fraction active de l'extrait de Nigelle contre la fragmentation de l'ADN et le désordre membranaire.

## Production scientifique et diplômante et Ouverture sur l'environnement

### I. PUBLICATIONS PARUES EN 2017

1. **Mohamed Guerfali, Ines Ayadi, Ameni Belhassen, Ali Gargouri, Hafedh Belghith.** Single cell oil production by Trichosporon cutaneumand lignocellulosic residues bioconversion for biodiesel synthesis.***Process Safety and Environmental Protection.*** **2018 Jan, Pages ; 113 : 292-304.**
2. **Amel Ben Garaa,Rihab Ben Abdallah Kolsi,Rim Chaaben,Nadia Hammami,Majed Kammoun,Francesco Paolo Pattie, Abdelfattah El Feki,Lotfi Fki,Hafedh Belghith,Karima Belghith.**Inhibition of key digestive enzymes related to hyperlipidemia and protection of liver-

kidney functions by Cystoseira crinita sulphated polysaccharide in high-fat diet-fed rats. ***Biomedicine & Pharmacotherapy.*** **2017 Jan;85:517-526.**

3. **Imen Lahmar,Greta Radeva ,Dessislava Marinkova, Maya Velitchkova,Hafedh Belghith,Ferjani Ben Abdallah,Lyubov Yotova,Karima Belghith.**Valorization of a plant β-amylase: Immobilization and dataset on the kinetic process. ***Data in Brief.*****2018 Feb;16:386-391.**
4. **Debouki-Joudi Saoussen, Trifa Fatma, Khabir Abdelmajid, Sellami-Boudawara, Tahia, Frikha Mounir, Daoud Jamel, Mokdad-Gargouri, Raja.** CpG methylation of APC promoter 1A in sporadic and familial breast cancer patients. ***Cancer Biomarkers.*****2017 Feb;18(2):133-141.**
5. **Rania Abdelmaksoud-Dammak, Nour Chamtouri, Mouna Triki, Amena Saadallah Kallel, Wajdi Ayadi, Slim Charfi, Abdelmajid Khabir, Lobna Ayadi, Tahia Sallemi-Boudawara, RajaMokdad-Gargouri.** Overexpression of miR-10b in colorectal cancer patients: Correlation with TWIST-1 and E-cadherin expression. ***Tumor Biology.*****2017 Mar;39(3).**
6. **Imen Lahmar, Hafedh Belghith, Ferjani Ben Abdallah, Karima Belghith.** Nutritional Composition and Phytochemical, Antioxidative, and Antifungal Activities of Pergularia tomentosa L. ***BioMed Research International.*** **2017 Mar;2017:6903817.**
7. **Ines Ben Hmad, Manel Boudabbous, Hafedh Belghith, Ali Gargouri.** A novel ionic liquid-stable halophilic endoglucanase from Stachybotrys microspora.**Process Biochemistry. 2017 Mar;54:59-66**
8. **Manel Boudabbous, Ines Ben Hmad, Walid Saibi, Mariem Mssawra, Hafedh Belghith, Ali Gargouri**. Trans-glycosylation capacity of a highly glycosylated multi-specific β-glucosidase from Fusarium solani. ***Bioprocess and Biosystems Engineering.*****2017 Apr;40(4):559-571.**
9. **Rihab Ben Abdallah, Kolsi, Hichem Ben Salah,Neila Jardak,Rim Chaaben,Abdelfattah El Feki,Tarak Rebai,Kamel Jamoussi,Noureddine Allouche,Hafedh Belghith,Karima Belghith.** Effects of Cymodocea nodosa extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. ***Biomedicine & Pharmacotherapy.*****2017 May;89:257-267.**
10. **Wafa Mihoubi , Emna Sahli, Ali Gargouri, Caroline Amiel.** FTIR spectroscopy of whole cells for the monitoring of yeast apoptosis mediated by p53 over-expression and its suppression by Nigella sativa extracts.***Plos One.*****2017 Jul 12;12(7).**
11. **Marwa Kharrat, Yosra Kamoun, Fatma Kamoun, Emna Ellouze, Marwa Maalej, Nourhene Fendri-Kriaa, Leila Ammar-Keskes, Neila Belghith, Ali Gargouri, Chahnez Triki, Faiza Fakhfakh.** Clinical, Molecular, and Computational Analysis in Patients With a Novel Double Mutation and a New Synonymous Variant in MeCP2: Report of the First Missense Mutation Within the AT-hook1 Cluster in Rett Syndrome. ***Journal of Child Neurology (JCN).*** **2017 Jul;32(8):694-703.**
12. **Mouna Triki, Marion Lapierre, Vincent Cavailles, Raja Mokdad-Gargouri.** Expression and role of nuclear receptor coregulators in colorectal cancer. ***World Journal of Gastroenterology (WJG).*****2017 Jul 7;23(25):4480-4490.**
13. **Surender Kumar, Sukhvinder, Vinod Kumar, Girish Kumar Gupta, Vikas Beniwal, Fatma Abdmouleh, Emna Ketata, Mehdi El Arbi.** Antibacterial, tyrosinase, and DNA photocleavage studies of some triazolylnucleosides. ***Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids***. **2017 Aug 3;36(8):543-551.**
14. **Ines Ben Hmad, Ali Gargouri.** Neutral and alkaline cellulases: Production, engineering, and applications. ***Journal of Basic Microbiology.*****2017 Aug;57(8):653-658**
15. **Amana Saadallah, Kallel Rania Abdelmaksoud Dammak, Mouna Triki, Slim Charfi, Abdelmajid Khabir, Tahia Sallemi-Boudawara, Raja Mokdad-Gargouri.** Clinical and prognosis value of the CIMP status combined with MLH1 or p16INK4a methylation in colorectal cancer. ***Medical Oncology.*****2017 Aug;34(8):147.**
16. **Rihab Ben Abdallah Kolsi,Hichem Ben Salah, Neila Jardak, Rim Chaaben, Imed Jribi, Abdelfattah El Feki, Tarak Rebai,Kamel Jamoussi, Noureddine Allouche, Cristophe Bleckerg, Hafedh Belghith, Karima Belghith.** Sulphated polysaccharide isolated from Sargassum vulgare: Characterization and hypolipidemic effects. ***Carbohydrate Polymers.*** **2017 Aug 15;170:148-159.**
17. **Gustavo Bravo-Ruiz, Azza Hadj Sassi, Marina Marcet-Houben, Antonio Di Pietro, Ali Gargouri, Toni Gabaldon , M. Isabel G. Roncero.** Regulatory Mechanisms of a Highly

Pectinolytic Mutant of Penicillium occitanis and Functional Analysis of a Candidate Gene in the Plant Pathogen Fusarium oxysporum. ***Frontiers in Microbiology.*****2017 Sep 8;8:1627.**

18. **Rihab Ben Abdallah Kolsi, Neila Jardak,Faten Haj kacem, Rim Chaaben,Imed jribi,Abdelfattah El Fekif, Tarak Rebai, Kamel Jamoussi, Lotfi Fki, Hafedh Belghith,Karima Belghith.** Anti-obesity effect and protection of liver-kidney functions by *Codium fragile* sulphated polysaccharide on high fat diet induced obese rats. ***International Journal of Biological Macromolecules.*** **2017 Sep;102:119-129.**
19. **Sihem Ben Abid, Mouna Sahnoun, InesYacoubiHadj-Amor, SalmaAbdelmoula-Souissi, Hajer Hassairi, Raja Mokdad-Gargouri,Ali Gargouri.** New Phage Display-Isolated Heptapeptide Recognizing the Regulatory Carboxy-Terminal Domain of Human Tumour Protein p53.***The Protein Journal.*****2017 Oct;36(5):443-452.**
20. **Hanen Mallek Fakhfakh,Jawhar Fakhfakh,Kamel Walha, Hajer Hassairi,Ali Gargouri, Hafedh Belghith.** Enzymatic hydrolysis of pretreated Alfa fibers *(Stipa tenacissima)* using β-d-glucosidase and xylanase of *Talaromyces thermophilus* from solid-state fermentation. ***International Journal of Biological Macromolecules.*** **2017 Oct;103:543-553.**
21. **Emna Ketata, Aref Neifar,Wafa Mihoubi,Pascal Pigeon, Hicham Gouzi,Jean Maurice Mallet,Siden Top,Girish Kumar Gupta,Gérard Jaouen, Ali Gargouri, Mehdi El Arbi.**The inhibition of tyrosinase by some aryl butenes: A desired activity or a side effect to avoid.***Journal of Organometallic Chemistry.*** **2017 Oct;848:133-141.**
22. **Nizar Akermi, Héla Mkaouar, Amin Jeblaoui, Aicha Kriaa, Ali Gargouri, Emmanuelle Maguin, Moez Rhimi.** Relevant Patented Biotechnological Applications of Ecotin: An Update. **Recent Patents on Biotechnology. 2017 Nov.**
23. **Sawssen Hajji, Rabeb Ben Slama-Ben Salem, Marwa Hamdi, Kemel Jellouli, Wajdi Ayadi, Moncef Nasri, Sami Boufi.** Nanocomposite films based on chitosan–poly(vinyl alcohol) and silver nanoparticles with high antibacterial and antioxidant activities.***Process Safety and Environmental Protection.*** **2017Oct;111:112–121**
24. **Awatef Taktak Ben Amar, Maram Morjen, Hazem Ben Mabrouk, Rania Abdelmaksoud Dammak, Mohamed Guerfali, Najla Fourati-Masmoudi, Naziha Marrakchi, Ali Gargouri.** Expression, purification and functionality of bioactive recombinant human vascular endothelial growth factor $VEGF_{165}$ in E. coli. ***AMB Express.*** **2017 Dec;7(1):33.**
25. **Rihab Ben Abdallah Kolsi, Hichem Ben Salah, Saber Abdelkader Saidi, Noureddine Allouche, Hafedh Belghith, Karima Belghith.** Evaluation of nutritional value, characteristics, functional properties of Cymodocea nodosa and its benefits on health diseases. ***Lipids in Health and Disease*****. 2017 Dec;16:238**

## II. BREVETS D'INVENTION DEPOSES EN 2017 :

1. **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 en date du 22 Février 2017).***
2. **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 en date du 22 Février 2017).***

## III. DIPLOMES

### III.1. Thèses

1. **Awatef TAKTAK-BEN AMAR :** Production de VEGF recombinant et son utilisation pour le criblage de banques de *Phage Display* pour l'identification de peptides anti-angiogéniques.***Soutenue le 23 Mai 2017.*** **(ENIS). (Encadreur : Pr. Ali Gargouri)*.***
2. **Mouna ALOULOU-ABDELKEFI :** Etudes moléculaires et biochimiques de naringinases chez le mutant CT1 de *Penicillium occitanis.* ***27 juin 2017. (FSS).*****( Ali Gargouri).**

3. **Mouna TRIKI :** Expression et rôle des corégulateurs transcriptionnelsRIP140 et LCoR dans les cancers gastro-intestinaux. ***30 Novembre 2017. (*****ENIS) ; (Raja Mokdad-Gargouri& Vincent Cavailles).**
4. **Wafa MIHOUBI :**Étude sur l'apoptose médiée par la surexpression de p53 chez *saccharomyces cerevisiae*:-Recherche et purification des molécules anti-apoptotiques d'origine végétale; Application de la technique de spectroscopie IRTF. ***12 Décembre 2017.*****(Faculté des Sciences de Bizerte). (Ali Gargouri).**
5. **Nesrine ALLAYA-JAAFAR** Régulation de l'expression de gènes dans le carcinome nasopharyngé.***Soutenue le 27 Décembre 2017.*** **(ENIS). (Ali Gargouri et Wajdi Ayadi).**
6. **Amana SAADALLAH-KALLEL :** Approches Moléculaires pour l'identification de Biomarqueurs chez des patients Tunisiens atteints de Cancer Colorectal. **(ENIS).** ***le 29 Décembre 2017*** **(Raja Mokdad-Gargouri).**

### III.2. Mastères de recherche12/07/2016

1. **Nadia MOHAMED:** Production simultanée de lipides intra et extracellulaires par une levure oléagineuse : Caractérisation biochimique et intérêt biotechnologique. ***Soutenu le 16 Décembre 2017.*****(FSS). (En cadreur : Mohamed Guerfali).**
2. **Malek JOMAA :**Mise au point d'une méthode d'agrégométrie sur microplaque et criblage de molécules à potentialités antiagrégantes. 1***6 Décembre 2017.*****(FSS). (Basma Hadjkacem).**
3. **Mariem DERBEL :**Etude de l'expression de la famille *Ten Eleven Translocation* dans le cancer du nasopharynx. ***16 Décembre 2017.*** **(FSS). (Wajdi AYADI).**

### III.3. Projets de Fin d'étude

1. **Sana SAAD:** Contribution à l'étude des propriétés anti-néoplasiques de la thymoquinone : cas de cancer du nasopharynx. ***14 juin 2017.*** **(ISBS). (Encadreur : Wajdi AYADI).**

# 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 | Post-Doc |
| Rouis Souad | Professeur | Damak Ines | Post-Doc |
| Kais Jamoussi | Maître de Conférences | Maissa Chakroun | Post-Doc |
| Hichem Azzouz | Maître de Conférences | Dalel Ben Farhat | Post-Doc |
| Raida Zribi | Maitre Assistante | Amel Mhaya | Doctorant |
| Olfa Frikha | Maitre Assistante | Mariam Hmani | Doctorant |
| Wafa Jallouli | Maitre Assistante | Kahla Yosra | Doctorant |
| Fatma Driss Zouari | Maitre Assistante | Mariam Ladhaar | Doctorant |
| Karama Bouassida | Maitre Assistante, IPEIS | Rim Miladi | Doctorant |
| Mariam Dammak | Maître Assistante, FSG | Hanen Dhouib | Doctorant |
| Zina Salhi | Technicienne | Samar Makni | Doctorant |
| Fathi Hertelli | Technicien | Yosra Ben Salah | Doctorant |
| Saoussen Gafsi | Ingénieure Contractuelle | Soumaya Ghribi-Sallem | Doctorant |
| Ben Abdallah Dorra | Post-Doc | Maryem Soudeni | Doctorant |
| Hanen Boukédi | Post-Doc | Jihen Mseddi | Doctorant |
| Saoussen Ben Khedr | Post-Doc | | Mastère de recherche |

## OJECTIF GENERAL

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

## OBJECTIFS SPECIFIQUES

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

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

**2**-Faire les études de laboratoire nécessaires pour compléter certaines exigences d'homologation des produits sélectionnés en I). Ces études porteront le cas échéant sur : 1) la mise à l'échelle de la

production massive du produit; 2) la formulation du produit; 3) la compréhension du mode d'action du produit; 4) la compatibilité du produit envers les produits conventionnels phytosanitaires utilisés dans les systèmes agricoles retenus pour les essais.
**3-**Comparer l'efficacité des biopesticides avec les systèmes conventionnels (pesticides) ainsi qu'entre les biopesticides sélectionnés s'attaquant au même problème phytosanitaire.

## INTITULE DES PROJETS DEVELOPPES

Les trois projets développés, convergent vers un seul et unique but à savoir la mise au point de biopesticides de différentes origines et natures, permettant de développer la lutte biotechnologique contre les ravageurs (insectes) et les pathogènes des plantes (bactéries et champignons) :
**Projet 1 :** Etude et Production de bioinsecticides d'origine microbienne et végétale
**Responsable :** Pr Slim Tounsi
**Projet 2 :** Etude et production de biofongicides d'origines microbienne et végétale
**Responsable :** Dr Kais Jamoussi
**Projet 3 :** Etude et production de Bactéricides d'origines microbienne et végétale
**Responsable :** Dr Olfa Frikha et Pr Slim Tounsi

## 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-Clonage de nouveaux gènes *cry* de *Bacillus thuringiensis* :**

La souche BUPM55 a été isolée à partir d'un sol tunisien et elle produit un biopesticide ayant une activité entomopathogène contre les diptères tel que: *Aedes aegypti*. Dans des travaux antérieurs, l'investigation de cette souche a conduit à la découverte et au clonage de nouveaux gènes de type *cry30*, *cry50* et *cry54*. Dans le cadre de l'étude moléculaire et biochimique de ces nouveaux gènes, nous avons réussi le clonage des gènes *cry30G, cry50B et cry54B* dans le vecteur d'expression pET28a-c inductible à l'IPTG (Figure 1). L'optimisation des conditions d'expression de ces trois nouvelles delta-endotoxines est en cours. En outre, le gène *cry30E* a été cloné dans le vecteur pBAD-GFPuv sous le contrôle du promoteur fort p-BAD inductible par l'arabinose. La nouvelle construction est appelée donc pBAD*cry30E*. L'analyse du mélange protéique sur gel SDS-PAGE montre l'absence de bande de taille attendue (78 kDa). Cependant, une bande de taille environ 50 kDa a été détectée. Par ailleurs, afin d'étudier l'expression, la cristallisation et la synergie d'action de la delta endotoxine Cry54B, le gène *cry54Br* a été cloné dans le vecteur navette *E. coli-B. thuringiensis* pHT*Blue*. L'analyse de l'expression de ce nouveau gène chez *B. thuringiensis* HD1*cry*B est en cours.

**1-2-Etude de la structure tridimensionnelle de la toxine Cry50B**

La structure tridimensionnelle de la protéine Cry50Br, codé par le gène *cry50Br* cloné, séquencé et exprimé chez une souche de *B. thuringiensis* acrystallifère, a été faite par modélisation comparative. La recherche de protéines similaires dans les banques de données des protéines par le programme BlastP montre que la séquence protéique du Cry50Br présente une similarité de 99% avec trois toxines Cry de type Cry50. L'alignement multiple montre sept substitutions entre les quatre séquences au niveau des positions : 186, 192, 381, 583, 588, 631 et 656.

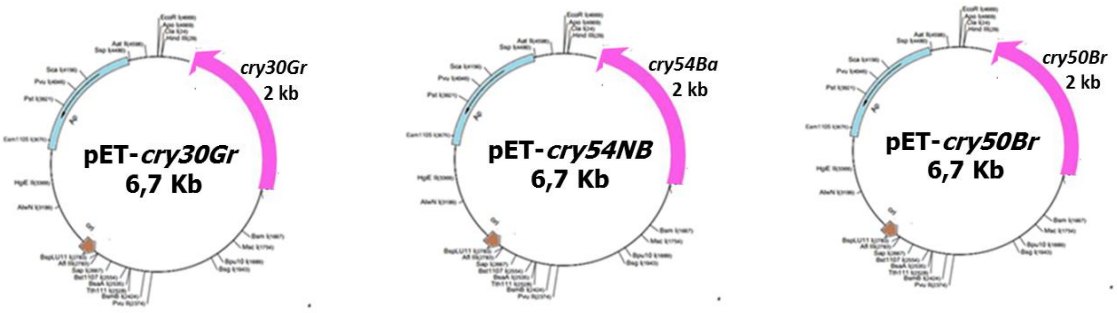



**Figure 1 :** Clonage des gènes *cry30Gr, cry50Br et cry54Br* dans pET28a-c

Pour mieux comprendre l'effet de ces substitutions sur la structure et étudier la relation structure-fonction, nous avons modélisé la structure de la toxine Cry50Br de la souche BUPM55 par modélisation comparative en utilisant le programme DeepView/ Swiss-PDB-Viewer (Ver 4.07). Par la méthode de recherche heuristique spécifique aux protéines (BLASTP), nous avons cherché dans les bases de données des structures (Protein Data Bank : PDB) de protéines présentant une forte similarité à la séquence protéique de Cry50. Les résultats obtenus montrent une similarité de séquences ≥ 67% avec les deux toxines Cry4Ba (code PDB : 4MOA et 1W99). Cette forte similarité de la séquence protéique montre que ces deux toxines peuvent être utilisées comme protéines de références pour modéliser la structure de la Cry50Br. Nous avons utilisé comme référence la structure de la toxine Cry4Ba (code PDB 4MOA). Par la suite, nous avons construit la structure tridimensionnelle du modèle de la protéine Cry50Br. Le 1$^{er}$ model a été affiné par plusieurs cycle de minimisation en utilisant le champ de force généralisé GROMOS96. La structure finale du modèle Cry50Br a été validée par analyse de la qualité stéréochimique de la structure obtenue en utilisant le programme PROCHECK. Sur la base des données obtenues, nous avons pu conclure que notre modèle est valide. Notre modèle est composé de trois domaines (domaine I, domaine II et domaine III) comme la structure des toutes les protéines Cry cristallisées. L'étude *in silico* de l'impact des mutations détectées dans la protéine Cry50Br sur l'activité larvicide contre les larves d'insectes cibles est en cours.

## 2-Bioinsecticides actifs contre les lépidoptères

### 2-1-Criblage et sélection de souches de *B. thuringiensis*

Recherche de souches hébergeant des gènes de type *cry2 et vip3* **:** Les protéines Cry2 et Vip3 ont récemment émergé comme de bons candidats utilisés pour lutter contre les insectes nuisibles et ainsi prévenir le phénomène de résistance des insectes aux δ-endotoxines. Les delta-endotoxines Cry2 constituent la 2*P*eme*P* famille des protéines Cry produites par Bt. Elles sont actives sur les larves de Lépidoptères et Diptères. Les Vip3 possèdent un mode d'action différent de celui des δ-endotoxines et ne présentent aucune homologie avec les protéines du cristal. Elles sont toxiques envers un large spectre de lépidoptères parfois différent de celui des protéines Cry. Le but de ce travail est donc la sélection des nouvelles souches de Bt se caractérisant par un contenu en gènes *cry2* et/ou *vip3* actives contre les trois lépidoptères *H. armigera* et *S. littoralis* qui présentent un important impact néfaste sur les cultures vu leur caractère ravageur. Pour ce faire, nous avons criblé une collection de souches de Bt pour la présence de ces gènes. Le criblage a été basé sur l'amplification génique par PCR. 13% des isolats ont montré la présence des gènes c*ry2* et l'absence des gènes *vip3* (c*ry2+/vip3-*), 40% sont (c*ry2+/vip3+*), 47% (c*ry2-/vip3-*) et 0% (c*ry2-/vip3+*.

Recherche de souches hébergeant des gènes de type *cry9* : Les delta-endotoxines de type Cry 9 de Bacillus thuringiensis sont toxiques contre les insectes résistants aux produits des gènes de type cry1A et particulièrement contre les espèces de Spodoptera. La noctuelle Spodoptera littoralis est considérée parmi les insectes les plus nuisibles à cause de sa polyphagie et sa résistance aux insecticides

chimiques. L'investigation par PCR de la présence du gène de type cry 9 chez 100 souches de B. thuringiensis, nous a permis de sélectionner 30 souches présentant le gène cry 9. L'évaluation de l'activité insecticide de ces souches contre les larves de S. littoralis a permis de sélectionner 4 souches ayant des toxicités comparables à celle de HD133 (89,63%). Ces souches pourraient être très prometteuses pour la mise au point des bioinsecticides à base de micro-organismes.

Recherche de souches hébergeant des gènes de type *cry1E* : Dans le cadre de la recherche de nouvelles toxines efficaces pour contourner les problèmes de résistances de *B. thuringiensis* nous avons choisi d'étudier les toxines de type Cry1E. La première étape porte sur le criblage des souches de *B. thuringiensis* hébergeant des gènes du type *cry1E* et clonage de ces gènes. Pour ce faire, une approche moléculaire a été adoptée. Elle consiste à la recherche du gène *cry1E* correspondant par une amplification PCR en utilisant des amorces spécifiques. Deux couples d'amorces ont été utilisés : un qui amplifie le cadre ouvert de lecture (ORF) ayant une taille de 3,5 kb; et un autre qui amplifie une partie interne du gène ayant une taille de 540 pb. 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 par les deux couples d'amorces à la fois. Il s'agit des isolats BLB350, BUPM14 et BUPM104 appartenant à priori à des sous-espèces différentes. La séquence de l'amplicon issu de la souche BUPM14 a été partiellement déterminée. La séquence a été comparée à celles déposées dans la banque de données NCBI. Elle représente une homologie de 100 % avec les douze premières séquences de gènes cry de différents isolats de *B. thuringiensis* dont la plupart représente des gènes de type cry1Ea. Un séquençage est actuellement en cours pour déterminer la séquence de tout le gène dans le but de repérer une éventuelle nouveauté.

### 2-2-Amélioration du pouvoir insecticides de *Bt* par l'expression de toxines de nématodes

Cette partie du travail entre dans le cadre de l'amélioration du pouvoir insecticide de *B. thuringiensis* en exploitant le potentiel du nématode *Steinernema carpocapsae* (*Sc*) dans le bio-contrôle des ravageurs. Les capacités entomopathogènes de *Sc* sont dues à sa spécificité et sa rapidité d'action, mais les difficultés de production, de stockage et d'application présentent un handicap de leur utilisation. C'est ainsi que notre stratégie vise l'exploitation des potentiels des deux organismes pour l'obtention d'un biopesticide plus performant. Il s'agit de la construction d'un vecteur de co-expression du domaine CCP appartenant à la protéase Sc-SP-3 de Sc avec la toxine Cry1Ac de la souche HD1 *kurstaki* de *B. thuringiensis*. La stratégie se compose de trois étapes qui permettront de mettre en juxtaposition les deux gènes correspondants. La première étape consiste à la construction d'un vecteur dans lequel est cloné le gène « CCP::CT ». Le clonage a été fait avec succès par PCR dans le vecteur de clonage « pGEM-T ». Actuellement, la deuxième étape est entamée ; Elle consiste à rapporter le gène *cry1Ac* dans la construction obtenue, par digestion/ligation. Dans la troisième étape, les deux gènes mis en juxtaposition seront transférés vers le vecteur d'expression chez *Bt*, pHTBlue. Quand la construction finale est obtenue, elle sera introduite chez *B. thuringiensis* et l'effet de l'expression sur la toxicité des recombinants sera étudié.

### 2-3-Les métalloprotéases InhA de *Bacillus thuringiensis* : Etude Moléculaire, Biochimique et activité insecticide

Les métalloprotéases InhA1 : La région d'ADN correspondant à la métalloprotéase mature InhA1 (taille de 71 kDa) a été amplifiée par PCR et cloné dans le vecteur pGEM-Teasy. Par la suite et dans le but de purifier cette métalloprotéase, le gène correspondant a été cloné dans le vecteur pET-28a. La réussite du clonage a été vérifiée par digestion enzymatique en utilisant les enzymes *Nhe*I et *EcoR*I, et par PCR et la construction ainsi obtenue a été appelé pET-inhA1-28a. La purification de cette métalloprotéase a été effectuée en utilisant le kit « HisTrap » d'Amersham et en se basant sur le fait qu'elle est produite fusionnée avec une queue de 6 Histidines à son extrémité N-terminale. La réussite

de la purification a été mise en évidence par un gel SDS-PAGE qui a révélé la présence de la protéine de fusion pure. L'effet des différents paramètres physico-chimiques (pH, UV, température, enzymes protéolytiques) sur l'activité d'InhA1 purifiée a été étudié. L'évaluation de l'activité insecticide de cette métalloprotéase est en cours. Par Ligand-Blot, nous avons montré

Les métalloprotéases InhA2 : Dans une autre partie de ce travail et dans le cadre d'un criblage d'une collection de huit souches de *B. thuringiensis,* nous avons montré que la souche BUPM216 possède un gène inhA2. Ce dernier a été cloné dans le vecteur pGEM-Teasy. Suite à ce clonage, un séquençage a été réalisé en utilisant comme matrice l'ADN du plasmide recombinant pGEM(inhA2-216) et différent amorces couvrant des régions variables du gène *inhA2*. L'analyse de la séquence partielle obtenue a montré que le gène *inhA2* de la souche BUPM216 est assez différent de celui publié. Ce gène sera aussi cloner dans le vecteur pET afin de le sur-exprimer chez E. coli et étudier

### 2-4-Production économique des biopesticides à base de *Photorhabdus temperata* : utilisation des eaux usées des industries agroalimentaires

Dans la première partie de ce travail, nous avons investigué l'effet de 5 effluents collectés à partir de différentes industries agro-alimentaires, sur la production, la cultivabilté et la toxicité de *P. temperata.* En effet, les résultats obtenus ont montré que l'eau usée (IPL), riche en azote, carbone, phosphore et minéraux permet d'avoir un nombre total de cellules de $4{,}16\times10^{8}$ cellules/ml et une UFC de $9\times10^{6}$ cellules/ml après 24 h de culture. Cette cultivabilité reste constante jusqu'à des temps prolongés de la culture. De plus, l'inhibition de croissance des larves d'*E. kuehniella* (11 %) ne diffère pas significativement de celle obtenue en utilisant le milieu complexe (12 %) confirmant que la culture de *P. temperata* dans les eaux usées promet un biopesticide potentiel en comparaison avec les résultats obtenus avec le milieu complexe. La substitution du milieu LB par l'eau usée (IPL) pour la préparation de la préculture, a permis d'obtenir la même production de biomasse. De plus, les résultats obtenus ont montré que l'utilisation d'un pourcentage d'inoculum de 5% a permis de diminuer le temps de latence, améliorer le taux de croissance et la production de biomasse.

Dans une deuxième étape, et afin d'améliorer la production de *P. temperata* utilisant les eaux (IPL) comme milieu alternatif de production de bioinsecticides, nous avons cherché à appliquer différentes méthodes de traitements de ces eaux avant de faire l'inoculation de *P. temperata.* Ainsi 4 types de traitements ont été appliqués sur ces effluents, à savoir le traitement acide, alcalin, thermo-acide et thermo-alcalin. Les résultats obtenus ont montré que l'hydrolyse acide des eaux (IPL) permet d'augmenter significativement la production et la toxicité du biopesticide à base de *P. temperata.* L'ajout du chlorure de sodium à une concentration de 5 g/l aux eaux usées hydrolysées a permis de doubler la production de biomasse et a contribué également à l'amélioration de la cultivabilité, ainsi que l'activité insecticide de la souche K122. De plus, nous avons montré que l'utilisation de l'eau de mer diluée permet de substituer l'apport de chlorure de sodium. Grâce à cette substitution, les cellules gardent le même potentiel d'activité insecticide ce qui représente un atout économique considérable.

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

### 1-Etude des activités fongicides des souches BLB276 et BLB374

Les tests d'antagonismes ont révélé que deux souches bactériennes BLB276 et BLB374 présentent d'importantes activités antifongiques avec une supériorité de BLB276 par rapport à BLB374. Une investigation précédente indique que BLB276 serait une *B. subtilis* et BLB374 serait une *B. amyloliquefaciens*. Ces deux souches ont montré une production de l'activité antifongique en milieu de la phase exponentielle et surtout au cours de la phase stationnaire. Cela signifie qu'elles produiraient des métabolites secondaires dotés d'activités antifongiques synthétisées par voies non ribosomales. En effet, la recherche des opérons de synthèse de lipopeptides a été entreprise par des amplifications PCR spécifiques de deux gènes pour chaque opéron. Ceci a montré que BLB276 produirait l'iturine alors que BLB374 produirait l'iturine et la fengycine qui sont des lipopeptides

capables de désintégrer la paroi fongique d'où la mort du champignon. Toutefois, l'analyse par zymographie a confirmé la production d'une molécule active vu la présence d'une zone d'inhibition unique chez les deux souches d'un Rf=0,56 qui serait l'iturine. En outre, la fengycine n'était pas mise en évidence par zymographie. Pour mieux caractériser ces métabolites, il était nécessaire de les concentrer et de les purifier en plusieurs étapes. Ainsi, l'extraction et le fractionnement des métabolites par HPLC couplé au test d'antagonisme ont révélé des fractions contenant l'activité antifongique. Des tests de protection du blé sont en cours de réalisation.

**2-Protection de la tomate contre la verticilliose :**

L'efficacité des méthodes de contrôle des maladies fongiques vasculaires reste limitée du fait du développement systémique du pathogène dans la plante. Pour leur gestion l'application de bactéries endophytes représente une approche potentielle. Dans ce cadre, une exploration des potentialités antifongiques de la souche C2 de *B. amyloliquefaciens* a été réalisée. Par des tests moléculaires et biochimiques, la souche C2 a montré une aptitude à produire multiples métabolites antifongiques tels que les sidérophores, les lipopeptides et les ploykétides, ainsi que des enzymes lytiques (protéase, glucanase et chitinase). En plus, multiples traits favorisant la croissance de la plante à savoir, la fixation de l'azote, la solubilisation de phosphate et la sécrétion d'hormone de croissance (AIA) sont détectés chez la souche C2. *In situ*, l'application de C2 sur les plantes de tomate a révélé son effet promoteur de la croissance ainsi que, son aptitude à la protéger contre la verticilliose. Par ailleurs, la colonisation de C2 dans les différents organes de la plante a été évaluée et a montré une concentration descendante de la population bactérienne en allant des racines vers les feuilles.

**3- Etude de l'effet de C2 sur la teneur et la mobilité de l'eau chez la tomate par IRM** (En collaboration avec U. de Montpellier)

La technique de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire permet d'extraire des informations morphologiques et physiologiques des tissus des plantes de tomates notamment la teneur et la mobilité de l'eau. Ainsi, morphologiquement, la souche C2 a montré un effet bénéfique sur le développement du diamètre de la tige en comparaison avec le témoin. En outre, pour la caractérisation physiologique de la tige, une analyse des cartographies et des calculs des moyennes de T1 (Temps de relaxation horizontale) et T2 (Temps de relaxation transversale) pour le xylème, cambium et la moelle, ont été réalisés. Nous avons constaté que T1 dans les plantes traitées sont plus longs par rapport aux T1 mesurés dans les plantes témoins. Cependant, ils sont plus courts comparativement à la référence d'eau (eau libre) (T1 long). Ceci peut être interpréter par le fait que la mobilité de l'eau est limitée dans les plantes traitées. Ainsi, la moelle des plantes traitées, qui présente des grandes cellules, a le T1 le plus long par rapport aux autres tissus (xylème et cambium). Pour les valeurs de T2, on ne voit pas une grande différence entre le T2 du xylème des plantules traitées et celui des témoins mais on a une différence claire de T2 dans la moelle et le cambium. Cette différence de T1 et T2 entre les plantes traitées et non traitées est proprement liée à la taille des cellules.

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

**1-Introduction** :

Les scientifiques cherchent à lutter contre les maladies causées par les phytopathogènes y compris les maladies bactériennes des plantes. Parmi celles-ci, le feu bactérien causé par *Erwinia amylovora* est l'une des plus anciennes maladies connues. C'est une maladie bactérienne systémique qui touche la plupart des espèces de la famille des Rosaceae tels que le pommier et poirier et quelques espèces de plantes ornementales (Vanneste et al., 2000). Le feu bactérien est une maladie très grave qui peut avoir des répercussions sur plusieurs années.

Afin de détruire l'agent causal de cette maladie, les agriculteurs ont utilisé les produits chimiques notamment la streptomycine. Ce dernier est considéré parmi les antibiotiques chimiques les plus efficaces. Mais vue l'apparition de la résistance chez le pathogène et les effets néfastes que pose ce

produit sur l'homme et l'environnement, le contrôle biologique, considéré comme une stratégie prometteuse pour la prévention contre le feu bactérien, est actuellement de plus en plus recherché et étudié. La lutte biologique se fait soit par l'utilisation de micro-organismes ou de leurs produits. Plusieurs bactéries ont été commercialisées pour la lutte contre *E. amylovora* telles que *Pantoa agglomerans, Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus subtilis*.

Au sein du laboratoire des Biopesticides, nous nous sommes intéressés à la recherche d'agents de lutte biologique contre *E. amylovora* appartenant à des bactéries épiphytes et à des souches de *Bacillus* sp.

### 2-Isolement et sélection de souches épiphytes actives contre *E. amylovora*

La première partie de notre travail a porté sur l'étude de la capacité de souches épiphytes du pommier et du poirier en tant qu'antagonistes contre *E. amylovora.* Vingt-cinq souches épiphytes ont été préalablement isolées dont leur séquençage est actuellement en cours. Le criblage de l'activité antibactérienne *in vivo* sur les feuilles de poirier détachées a été réalisé. Les souches PF19, PF8, PF18' et P.F4 ont permis une meilleure réduction des symptômes de la maladie causée par *E. amylovora*. La souche P.F4 est considérée comme la meilleure souche antagoniste vue qu'elle présente le maximum de feuilles non infectées avec l'absence de feuilles avec des degrés de symptômes élevés. La capacité des surnageants de culture des bactéries épiphytes produits dans le milieu LB à réduire l'incidence de la maladie a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré l'absence d'effet antagoniste pour les surnageants de culture de toutes les souches. L'activité observée pour les 4 souches les plus intéressantes n'est pas donc due au mécanisme d'antibiose.

### 3-Sélection de souches de Bacillus sp. actives contre *E. amylovora*

Dans la deuxième partie, nous avons investigué l'activité antibactérienne de dix souches de *Bacillus* en tant qu'antagonistes contre *E. amylovora*. Dans un travail antérieur, nous avons montré que les dix souches présentent de l'activité *in vitro* mais à des degrés variables. Afin de rechercher l'origine de l'activité chez les souches les plus actives, l'amplification des gènes de biosynthèse des composés antimicrobiens a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que l'activité est liée à la présence des gènes *fenD*, *dfnA*, *mlnA* et *baeA* codant pour la fengycine, la difficidine, la macrolactine et le bacillaene, respectivement. Au cours de l'année 2017, l'étude *in vivo* de la capacité des souches à réduire l'incidence de l'infection par *E. amylovora* a été réalisée. La meilleure souche était la 32a. Celle-ci serait un bon candidat pour la lutte contre le feu bactérien. En effet, cette souche a présenté le pourcentage d'inhibition le plus élevé. Il est bien connu que l'activité des souches de *Bacillus* contre *E. amylovora* est due à leurs molécules antibactériennes produites notamment les polykétides. Ainsi nous nous sommes proposés de tester *in vivo* sur feuilles de poirier l'effet des molécules antibactériennes produites par les souches de *Bacillus sp.*. Les résultats obtenus ont montré que les surnageants de cultures ainsi que leurs extraits méthanoliques sont d'une efficacité limitée pour la lutte contre le feu bactérien dans les conditions testées.

## PUBLICATIONS INTERNATIONALES PARUES EN 2017:

**1**-Khedher MRB, Khedher SB, Chaieb I, Tounsi S, Hammami M. (2017) Chemical composition and biological activities of Salvia officinalis essential oil from Tunisia. *EXCLI J.* 16:160-173. doi: 10.17179/excli2016-832.

**2**-Abdelmalek N, Sellami S, Kallassy-Awad M, Tounsi MF, Mebarkia A, Tounsi S, Rouis S. (2017) Influence of *Ephestia kuehniel*la stage larvae on the potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa delta-endotoxin. *Pestic Biochem Physiol.* 137:91-97.

**3**-Boukedi H, Ben Khedher S, Ghribi D, Dammak M, Tounsi S, Abdelkefi-Mesrati L. (2017) Quantification of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 Entomopathogenic Toxin Using Its Hemolytic Activity. *Curr Microbiol.* 74:584-588.

**4**- Boukedi H, Ben Khedher S, Hadhri R, Jaoua S, Tounsi S, Abdelkefi-Mesrati L. (2017) Vegetative insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* BLB459 and its efficiency against Lepidoptera. *Toxicon.* 129:89-94.

**5**-Masmoudi F, Ben Khedher S, Kamoun A, Zouari N, Tounsi S, Trigui M. (2017) Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating Botrytis cinerea. *Microbiol Res.* 197:29-38.
**6**-Ben Khedher S, Boukedi H, Dammak M, Kilani-Feki O, Sellami-Boudawara T, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S. (2017) Combinatorial effect of Bacillus amyloliquefaciens AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. *J Invertebr Pathol.* 144:11-17.
**7**- Chakroun M, Sellami S, Ferré J, Tounsi S, Rouis S. (2017) *Ephestia kuehniella* tolerance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa is associated with reduced oligomer formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 482:808-813.
**8**-Mhalla D, Bouaziz A, Ennouri K, Chawech R, Smaoui S, Jarraya R, Tounsi S, Trigui M. (2017) Antimicrobial activity and bioguided fractionation of *Rumex tingitanus* extracts for meat preservation. *Meat Sci.* 125:22-29.
**9**-Olfa Frikha-Gargouri, Dorra Ben Abdallah, Imen Ghorbel, IkramCharfeddine, Lobna Jlaiel, Mohamed Ali Triki and Slim Tounsi (2017) Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress Agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. *Pest Manag Sci*, 73: 568–574 DOI 10.1002/ps.4331
**10**-Frikha-Gargouri O, Ben -Abdallah D, Bhar I, Tounsi S (2O17) Antibiosis and bmyB Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient Bacillus Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. *Front Plant Sci.* 14;8:1363.
**11**-Kahla Y, Zouari-Bouassida K, Rezgui F, Trigui M, Tounsi S (2017) Efficacy of Eucalyptus cinerea as a Source of Bioactive Compounds for Curative Biocontrol of Crown Gall Caused by Agrobacterium tumefaciens Strain B6. *Biomed Res Int. 2017* doi: 10.1155/2017/9308063
**12**-Zribi Zghal R, Elleuch J, Ben Ali M, Darriet F, Rebaï A, Chandre F, Jaoua S, Tounsi S (2017) Towards novel Cry toxins with enhanced toxicity/broader: a new chimeric Cry4Ba / Cry1Ac toxin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2101:5949.
**13**- Karama Zouari Bouassida, Sana Bardaa, Meriem Khimiri, Tarek Rebaii, Slim Tounsi, Lobna Jlaiel, and Mohamed Trigui (2017) Exploring the Urtica dioica Leaves Hemostatic and Wound-Healing Potential. *BioMed Research International* ID 1047523.
**14**-Mouna Tabebia, Bodour Khabou, Hanen Boukadi, Mariam Ben Hamada, Bochra Ben Rhouma, Slim Tounsi, Abdellatif Maalej, Hassen Kamoun, Leila Keskes-Ammar, Mohamed Abid,Mouna Mnif, Faiza Fakhfakhd (2018) Association study of apoptosis gene polymorphisms in mitochondrial diabetes: A potential role in the pathogenicity of MD. *Gene* 639: 18–26.
**15**-Zalila-Kolsi, I., Sellami, S., Tounsi, S., Jamoussi, K. (2017). Heterologous expression and periplasmic secretion of an antifungal *Bacillus amyloliquefaciens* BLB369 endo-β-1,3-1,4- glucanase in *Escherichia coli*. J. *Phytopathology.* 2017, 1-6.
**16**- Bachir Kamilia, Tail Ghania, Bouragba Nadia, Zamoum Mohamed, Trigui Mohamed, Tounsi Slim and Saidi Fairouz (2017) Synergic effect between *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD1 δ-endotoxins and Melia zedarach (Meliacea) methanolic extract against the larvae of Thaumetopoea pityocampa Den. & Schiff. (Lepidoptera, Notodontidae). *J. ent. Res.*, 41: 343-352.
**17**- Karim Ennouri, Rayda Ben Ayed, Mohamed Ali Triki, Ennio Ottaviani, Maura Mazzarello, Fathi Hertelli, Nabil Zouari (2017) Multiple linear regression and artificial neural networks for deltaendotoxin and protease yields modelling of *Bacillus thuringiensis*. 3 *Biotech 7*: 187. DOI 10.1007/s13205-017-0799-1.
**18-** Hmani M, Boukedi H, Ben Khedher S, Elleuch A, Tounsi S, Abdelkefi-Mesrati L (2017) Improvement of Vip3Aa16 Toxin Production and Efficiency Through Nitrous Acid and UV Mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae). *J Econ Entomol.* Doi: 10.1093/jee/tox328.

## FORMATION DIPLOMANTE :

### THESES

**1- DAMMAK Ines : Les** métalloprotéases InhA de *Bacillus thuringiensis* : Etude moléculaire, Expression et Activité Biopesticide. DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, soutenue le 22/04/ 2017. Directeur de thèse Slim TOUNSI.

**2- MHALLA Dhekra :** Caractérisation phytochimique et potentialités biologiques de deux plantes endémique. DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, soutenue le 02/02/2017. Directeur de thèse : Mohamed TRIGUI.
**3- Fatma Masmoudi :** Developpement de deux approches biotechnologiques pour l'amélioration de la résistance de la tomate aux maladies cryptogamiques et au stress salin. DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, soutenue le 06/12/2017. Directeur de thèse : Mohamed TRIGUI.

## MASTERES

**1- Soumaya Ghribi-Sallem :** Mastère de recherche (régime LMD), spécialité Biotechnologie Microbienne de. Faculté des Sciences de Sfax. Titre : « Etude d'activités antagonistes de souches de *Bacillus* spp. ». Encadrant : Dr. Kaïs Jamoussi (Soutenance : le 14 Décembre 2017).
**2- Yesmine Kallel :** Master en Biodiversité et Dynamique des Ecosystèmes, Faculté des Sciences de Sfax, Titre : « Investigation des activités antibactériennes *in vivo* de souches épiphytes et de souches de *Bacillus sp.* contre *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien » 2016-2017. Encadreur : Olfa Frikha Gargouri.
**3- Ameni Ben Ameur** : Mastère de recherche spécialité Génomique et Protéomique de la FSS, intitulé du sujet : Titre : « Recherche et étude de nouvelles deta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* à activité insecticide contre les moustiques». Encadreur : Raida Zribi Zghal.

## BREVET:

**Titre:** Identification d'un nouveau bioinsecticide d'une souche tunisienne (BLB406) de *Bacillus thuringiensis* constitué de nouvelles delta-endotoxines actives sur les larves d'insectes appartenant à la famille des diptères et vecteurs de maladies.
**Inventeurs :** Zribi Zghal Raïda, Elleuch Jihen, Ghedira Kais, Kharrat Marwa, Tounsi Slim **(2017). INNORPI- TN 2017/138.**

## OUVERTURE DU LABORATOIRE SUR SON ENVIRONNEMENT

Organisation d'un Workshop Tuniso-Allemand « Innovation in plant protection » le 23-02-2017 à Sfax, Tunisie

## CONVENTIONS SIGNEES AVEC DES ENTREPRISES

**1- Convention avec Médis** : Le CBS (laboratoire des Biopesticides) concède à Médis une licence de droit d'exploitation en vue de la fabrication et la vente d'un bioinsecticide actif sur les lépidoptères et à base d'une souche de *Bacillus thuringiensis* appartenant à la sous-espèce *kurstaki*, nommée BLB1.
***Montant de la convention : 100 Mille dinars + 5 % des ventes nettes (annuellement)***
**2- Convention avec Vienat :** Convention de recherche collaborative de recherche : Cette recherche collaborative a pour objet la mise au point d'un principe actif pour une crème hémostatique et cicatrisante à partir d'une plante tunisienne, *Emex spinosa*.
***Montant de la convention : 10 Mille dinars + 2,5 % des ventes nettes (annuellement)***

## PROJETS INTERNATIONAUX SIGNEES EN 2017

**Projet** 1- STomP: Sustainable Tomato Production: plant defence enhancement, development of new biopesticides and optimization of environmental, water and chemical inputs (**2016 – 2019**)", **ARIMnet 2 (En collaboration avec Pr Noureddine Allouche-FSS).**
**Projet** 2- Development of microbial agents for control of plant diseases and insect pests **(2016-2018**), **TUN-GER Cooperation**
**Projet 3-** IPM-4-Citrus: Citrus disease Integrated Pest Management: from Research to Market (**2017-2020**), **RISE-H2020**
**Projet 4-** BIOSMAN: Towards real-time monitoring of *Bacillus thuringiensis* biopesticides production using laser Speckle imaging within a Mediterranean area network (**2017-2020**), **ERANETMED**
**Projet 5-** Huplant Control: Control of human pathogenic micro-organisms in plant systems **(2017-2021), COST-H2020**

**Projet 6-** Proteomic analysis of the interaction of Agrobacterium tumefaciens and Erwinia amylovora bacterial phytopathogens with *Bacillus* biocontrol agents and their active compounds *in vivo* and in plants**. (2017-2019), TUN-INDIA Cooperation**

**Projet 7: Projet IFS** (2017-2019)**:** Development of biocontrol agents against bacterial phytopathogens *Agrobacterium tumefaciens* and *Erwinia amylovora* based on lipopepetides and/or polyketides. ***Budget: 12 Mille Dollars***

**Projet 8 :** Valorisation des eaux salines dans le domaine agricole après magnétisation.

Etude et Evaluation des effets de cette technologie sur les eaux, les sols et les cultures **(Projet PRF, 2017-2019). En collaboration avec Pr Monem Kallel**

**Projet 9 :** Approche Intégrée de l'utilisation des symbioses légumineuses-PGPR pour la promotion de la fertilité du sol, la préservation de l'environnement et de l'agriculture durable du blé **(Projet PRF, 2017-2019). En collaboration avec Pr Ahmed Mliki**

# LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes

# (LBAP)

## مخبـر البيوتكنولوجيا وتحسين النباتات

**Responsable : Pr. Faiçal BRINI**

**Email : faical.brini@cbs.rnrt.tn**

## LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

| Nom et Prénom | Qualité | Nom et Prénom | Qualité |
|---|---|---|---|
| Faiçal Brini | Maitre de Conférences | Malika Ayadi | Ingénieur Principal |
| Habib Khoudi | Maitre de Conférences | Chedya Boughanmi | Technicien |
| Walid Saibi | Maitre de Conférences | Sarra Namani | Secrétaire |
| Inès Yakoubi | Maitre Assistant | Mohamed Brahmi | Ouvrier |
| Mouna Choura | Maitre Assistant | Sahar Sellami | En Thèse |
| Nejib Saidi | Maitre Assistant | Habib Mahjoubi | En Thèse |
| Rania Ben Saad | Maitre Assistant | Sana Koubaa | En Thèse |
| Ikram Zaidi | Maitre Assistant | Mariem Bradaii | En Thèse |
| Moez Hanin (ISBS) | Professeur | Marwa Harbaoui | En Thèse |
| Ebel Chental (ISBS) | Maitre Assistant | Hassiba Bouazzi | En Thèse |
| Mondher Mejri (ISB) | Professeur | Dhawiya Merghebi | En Thèse |
| Mouna Ghorbel | Post-doc | Fatma Boukid | En Thèse |
| Sana Tounsi | Post -doc | Hajer Ziadi | En Thèse |
| Héla Safi | Post -doc | Sawssen Harzalli | En Thèse |
| Rania Jmal | Post -doc | Marwa Bouhlel | En Thèse |
| Karama Hamdi | Post -doc | Ons Bahloul | En Mastère |
| Nabil Zouari | Post -doc | | |

## 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. Facteurs de transcription répondant à l'éthylène : Optimisation du niveau d'expression du gène *TdSHN1* du blé dur dans le tabac transgénique**

Nous avons rapporté précédemment que l'expression ectopique du facteur d'expression répondant à l'éthylène, *TdSHN1*, isolé à partir d'une variété tunisienne de blé dur permet d'améliorer la tolérance de tabac transgéniques à différents types de stress tels que la salinité et la sécheresse. Cette tolérance est étroitement liée à une forte capacité anti-oxydante ainsi qu'à une réduction significative de la densité stomatique, chez les lignées transgéniques, ce qui a permis à cette dernières de conserver plus d'eau pendant les divers stress. Toutefois, l'expression d'un nouveau trait chez les plantes, tel que la tolérance à la sécheresse, nécessite un niveau d'expression assez élevé pour impacter positivement le rendement des plantes. Pour cela, et afin de garantir une expression optimale du transgène, nous avons évalué l'effet de l'expression du gène *TdSHN1* pleine longueur, incluant son intron, sur le niveau de tolérance conféré par ce facteur de transcription. Les résultats obtenus ont montré que la machinerie d'épissage de tabac a reconnu l'intron du blé dur et a réalisé un épissage correct résultant en un ARNm de la même taille que celui du cDNA. En plus, les analyses moléculaires, physiologiques et anatomiques effectuées sur des lignées transgéniques ont montré, qu'effectivement, l'ajout de l'intron dans la construction génétique permet une meilleure tolérance aux stress salin et hydrique comparativement à l'expression de l'ADNc TdSHN1 correspondant (Fig. 1).

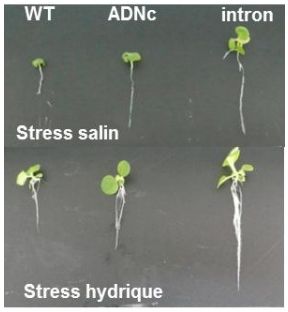



**Figure 1.** Phénotype des plantes transgéniques issues des constructions ADNc, ADNc-Intron et plantes témoins (WT) après un stress hydrique (300 mM mannitol) et salin (200 mM NaCl).

## 2. Les Facteurs de transcription NAC

L'objectif principal de cette action de recherche consiste à identifier les membres de la famille de facteurs de transcription de type NAC chez le blé dur à partir des bases de données transcriptomiques disponibles publiquement. Ensuite, de sélectionner des gènes candidats (GC) impliqués dans la réponse aux stress biotique et/ou abiotique. Cette sélection est basée sur des analyses phylogénétiques et des études de leurs profils d'expression *in silico*. Une analyse d'expression par RT-PCR quantitative de ces gènes candidats lors des stress salin et hydrique, est envisagée pour confirmer leur rôle dans la réponse à ses stress chez un génotype tolérant de blé dur (Om Rabiaa). Dans une première partie de ce projet, des données issues de séquençage de transcriptome de blé ont été utilisées pour identifier les gènes codant pour des protéines NAC. En effet, durant cette partie, on a récupéré des séquences protéiques de facteur de transcription NAC d'autres plantes à partir de la base de donnés Genbank. Par la suite, ces séquences ont été utilisées pour identifier ceux du blé tendre. Ainsi, 165 séquences non redondantes avec un domaine NAC complet ont été identifiées. Ces gènes ont été soumis à des analyses phylogénétiques dans le but de comparer les séquences de blé dur avec ceux d'autres plantes monocotylédones (riz et orge) et dicotylédones (Arabette et vigne). La localisation chromosomique de ces gènes a été ensuite déterminée en utilisant les séquences du génome de blé tendre comme référence. Cette dernière analyse a permis de déterminer la localisation de ces gènes sur les chromosomes et d'identifier les gènes provenant d'évènements de duplication de régions chromosomiques. L'étude d'expression *in silico* des gènes NAC a pour but de faciliter le choix des gènes candidats pour la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Notre expérience en

bioinformatique couplé à l'utilisation des outils de génomique fonctionnelle des plantes, a facilité l'analyse d'expression des gènes NAC à partir des données microarray de blé dur et de blé tendre disponibles publiquement. L'ensemble des analyses d'expression *in silico* des gènes NAC ont permis d'identifier quelques gènes impliqués dans la réponse aux stress biotique et/ou abiotique. En outre, sept gènes sont surexprimés sous conditions de stress hydrique, salin et biotique, quatre gènes et deux gènes sont impliqués spécifiquement dans la réponse aux stress salin et hydrique, respectivement. En se basant sur les analyses phylogénétiques et les donnés microarray, cinq gènes candidats ont été sélectionés pour effectuer des études d'expression par RT-PCR. L'étude d'expression a montré que quatre gènes sont modulés par le stress salin et trois gènes par le stress hydrique. Les profils d'expressions obtenus par RT-PCR corroborent les résultats obtenus par étude d'expression *in silico*. En outre, deux gènes candidats ont été sélectionnés pour des études fonctionnelles, il s'agit de deux gènes homologues nommé TtNAC2A et TtNAC2B impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. Dans ce contexte, on a isolé, cloné, séquencé et caractérisé le TtNAC2A et TtNAC2B à partir du blé dur. Les résultats de l'analyse des séquences d'acides aminés déduites ont révélé que les deux gènes partageaient 98% d'identité alors que les séquences les plus divergentes étaient observées dans les régions 3'UTR. De plus, ces deux NAC hébergent une structure intro-exon conservée parmi d'autres céréales. D'autre part, l'analyse comparative des promoteurs in *silico* a révélé la présence de nombreux éléments régulateurs cis associés au stress impliqués dans la réponse à divers stress biotiques et abiotiques (sécheresse, salinité et froid) ainsi que la réponse hormonale (ABA, MeJA, Auxine). Les régions promotrices de ces gènes ont été isolées et clonées en amont d'un gène rapporteur GUS. La génération de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant le gène GUS sous contrôle de deux promoteurs est en cours. Sur un autre volet, on s'est intéressé à comparer le niveau d'expression de TtNAC2A et son homologue sur le génome B chez deux variétés du blé dur Om Rabiaa et Mahmoudi qui présentent une différence de tolérance au stress salin et hydrique par RT-qPCR. Ces analyses ont été menées sur les feuilles et les racines de 2 variétés soumises à divers types de stress (stress salin, hydrique et traitement par l'ABA). L'analyse de l'expression a montré que les deux gènes étaient exprimés différemment dans des conditions de stress chez les deux génotypes. Les rapports d'expression relatifs les plus élevés ont été enregistrés dans le génotype tolérant au stress (Om Rabiaa) comparé au génotype sensible (Mahmoudi). En effet, l'induction de deux gènes dans la réponse aux stress abiotiques s'effectue de manière indépendante de l'ABA. Pour caractériser d'avantage les NACs : TtNAC2A et TtNAC2B, les gènes entiers, les régions N-terminales (domaine NAC) et les régions C-terminales ont été amplifiés et intégrés dans le vecteur pGBKT7 pour déterminer la région responsable de l'activation ou la répression de la transcription. Les tests de trans-activation ont révélé que les deux gènes sont des activateurs de la transcription et que leurs régions C-terminales étaient responsables de l'activation de la transcription.

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

Dans le but d'améliorer la tolérance des céréales notamment le blé dur et l'orge au stress salin et hydrique, nous avons étudié le potentiel d'une plante halophyte *Aeluropus littoralis* pour isoler les gènes cibles qui sont impliqués dans les mécanismes de réponse de cette plante aux stress environnementaux. Ainsi, *A. littoralis* constitue une ressource génétique précieuse non seulement pour comprendre les mécanismes moléculaires de réponse aux stress chez les monocotylédones mais aussi pour améliorer la tolérance aux stress abiotiques chez les cultures à importance économique. Nous avons isolé à partir *d'A. littoralis* un certain nombre de gènes certains codant pour des protéines à fonction connus et d'autres à fonction inconnus. Parmi ces derniers, nous avons sélectionné un gène qui code pour une nouvelle protéine nommée **AlSRG1** (***A****eluropus* ***l****ittoralis* **S**tress **R**elated **G**ene 1) à

fonction inconnu spécifique de la plante halophyte *A. littoralis*. La base des données de domaine conservée a révélé qu'AlSRG1 contient un domaine de la superfamille RRM-SF. Nous avons démontré, par qPCR, que ce gène est inductible chez *A. littoralis* par le stress salin (350mM NaCl) et hydrique (10% PEG 8000) (Fig. 2).

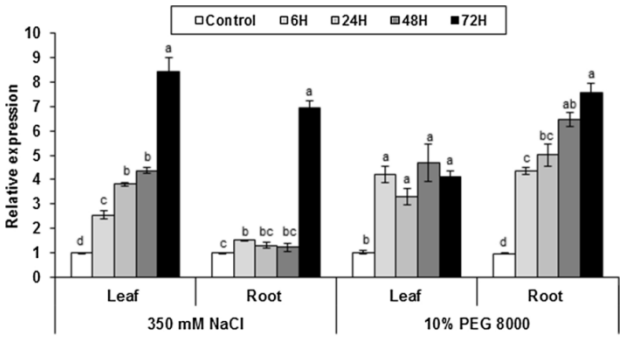



**Figure 2** : Etude du profil d'expression par RT-qPCR du gène *AlSRG1* chez *Aeluropus littoralis* stressé par le NaCl 350 mM et le PEG10% en fonction du temps.

En se basant sur le fait que le gène *AlSRG1* est inductible par les stress abiotiques, nous avons réalisé l'étude fonctionnelle du gène *AlSRG1* dans un système hétérologue de tabac. Des plantes transgéniques de tabac sur-exprimant le gène *AlSRG1* sous le contrôle du promoteur constitutif 35S-CaMV ont été produites. Les lignées transgéniques obtenus (S1, S2 et S5) et dont la surexpression du transgène a été vérifiée par northern blot et le nombre de copie par Southern blot, ont manifesté un niveau de tolérance important contre le stress salin et osmotique *in vitro*. La surexpression du gène *AlSRG1* au niveau des plantes transgéniques de tabac a également augmenté les niveaux de transcription des gènes reliés aux stress, par rapport au WT, en condition de stress salin et osmotique. Pour investiguer la base physiologique de cette tolérance au stress salin et osmotique, plusieurs paramètres (teneurs en MDA, $H_2O_2$ et proline) 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 faible accumulation de MDA, de proline et du $H_2O_2$ diminuant ainsi le taux des composés oxygénés réactifs (ROS). Ces résultats ont été confirmé par des tests histochimiques en utilisant les produits spécifiques NBT et DAB pour détecter les ROS superoxyde ($O_2^-$) et le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$). L'ensemble de ces résultats a permis de conclure que suite à un stress salin et osmotique, les lignées surexprimant le gène *AlSRG1* accumulent moins de ROS dans leurs feuilles. En accord avec les tests de coloration histochimique, les lignées transgéniques (S1, S2 et S5) avaient des niveaux de $H_2O_2$ et du MDA significativement réduits par rapport à ceux des plantes WT surtout dans des conditions de stress salin et osmotique. Puisque l'expression du gène *AlSRG1* a permis la croissance *in vitro* des plantes transgéniques de tabac en condition de stress salin et osmotique, il était important d'étudier son effet ultime sur la production des semences et aussi sur le rendement. A cette fin, des expériences de tolérance à la salinité et à la sécheresse ont été réalisé sur les trois lignées transgéniques T2 (S1, S2 et S5) et le WT en conditions de serre. Les plantes transgéniques de tabac ont présenté une tolérance accrue aux stress abiotiques comme la salinité (350 mM NaCl), la sécheresse (la teneur relative en eau (RWC) = 25%). En plus, 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 (Fig. 3).

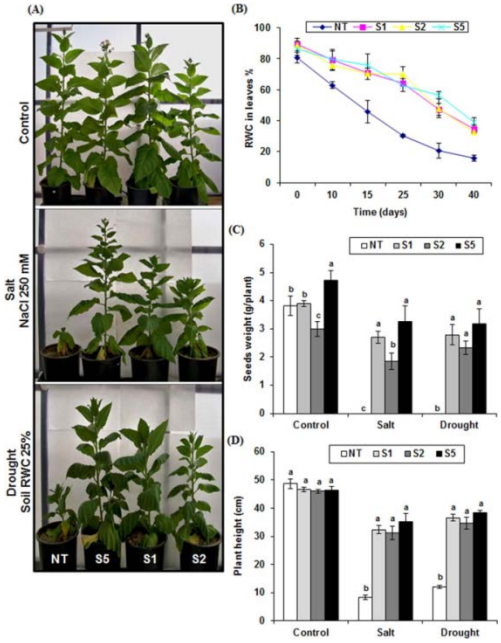



**Figure 3** : Etude de la tolérance des plantes transgéniques du tabac AlSRG1 au stress salin (NaCl 250 mM) et hydrique (RWC 25%) en condition de la serre.

L'ensemble de ces résultats ont montré qu'*AlSRG1* 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 : Signalisation et mécanismes de tolérance aux stress

### 1. Caractérisation fonctionnelle et moléculaire de la MAP Kinase phosphatase du blé (TMKP1) dans la réponse au stress abiotique

Les MAPKs (mitogen activated protein kinases) jouent un rôle déterminant dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Le bon fonctionnement de ces MAPKs nécessite l'intervention de protéines phosphatases telles que les MAPK phosphatases (MKP) qui déphosphorylent à la fois les résidus sérine/thréonine et tyrosine des MAPK cibles. A travers le logiciel scansite 3 (http://scansite3.mit.edu)/), un motif conservé de liaisons aux 14-3-3s de type I a été identifié au niveau de la position 574-580 (KLPSLP) de la protéine TMKP1. Afin de vérifier si TMKP1 et les protéines 14-3-3 peuvent interagir, des essais de co-immuno-précipitation (IP) ont été employées. Ces IP ont été réalisées sur des extraits de deux variétés Tunisiennes de blé dur en employant les anticorps anti-14-3-3 et anti-TMKP1. L'ensemble des résultats obtenus démontrent de manière claire que TMKP1 et des protéines 14-3-3 peuvent faire partie d'un même complexe *in vivo*. Des tests d'activité phosphatase ont montré que TMKP1 augmente en présence de différentes isoformes de 14-3-3.

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

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

Chaque année, une grande quantité d'engrais phosphatés est appliquée aux terres cultivables mais seulement 10 à 20% du phosphore ajouté est prélevé par les cultures. La plus grande quantité du phosphore ajouté au sol est rapidement fixée en fraction inorganique et fraction organique très peu disponibles pour les racines des plantes. Par conséquent, l'année suivante une nouvelle fertilisation

sera quand même requise et la quantité de P qui se retrouve dans l'environnement augmente ainsi d'année en année. Ainsi, l'apport important d'engrais phosphatés est non seulement coûteux mais cause des problèmes de pollution environnementale. En fait, 50-80% du P total dans les sols agricoles existe sous forme de P organique dont le composant le plus prépondérant est l'acide phytique qui n'est pas disponible aux plantes sauf s'il est hydrolysé par des enzymes spécifiques « les phytases ». Au sein du LPAP au CBS, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une phytase PHY US417 de la souche de *Bacillus subtilis* isolée par le laboratoire d'Enzymes et de Métabolites des Procaryotes. Dans ce contexte, on a démontré précédemment que la phytase PHY US417 ajoutée au milieu ou produite par des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* a la capacité de stimuler la croissance des plantes sur un milieu de culture dépourvu en P et contenant l'acide phytique (AP). D'autres expériences nous ont aussi permis de conclure que l'AP intervient dans la régulation de l'homéostasie et la signalisation du phosphate et du sulfate. Récemment on a démontré que la surexpression de la phytase PHY-US417 chez *Arabidopsis* confère une meilleure tolérance aux stress et en particulier le stress osmotique, associée à une plus faible sensibilité à l'ABA. Ces lignées transgéniques montrent une meilleure performance par rapport aux plantes sauvages qui se traduit par un développement racinaire plus important et par le maintien de leur activité photosynthétique. En plus, elles ont une plus grande capacité à surmonter les effets néfastes du stress oxydatif en accumulant plus d'AsA et aussi suite à l'activation des enzymes antioxydantes.

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

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

## 3. Essais d'amélioration de la productivité végétale en conditions de stress chez le blé via un régulateur du cycle cellulaire : Isolement du gène TdRL1 de blé, et étude de son implication dans la réponse aux stress abiotiques impliqué dans le contrôle cellulaire

Parmi les gènes candidats présents au sein du Laboratoire de Protection et d'Amélioration des Plantes du CBS, nous avons isolé l'homologue de blé dur de la protéine RSS1 isolée et décrite par Ogawa *et al.* (2011) chez le riz. Le mutant *rss1* de riz (rice salt-sensitive 1) est hypersensible au stress salin. Le

clonage du gène muté dans *rss1* révèle un gène codant pour une protéine de 243 aa. Ce gène est présent chez tous les monocots mais semble absent chez les eudicots comme *A. thaliana*. La protéine RSS1 s'exprime dans les cellules en division, et sa stabilité est régulée par 'la voie de dégradation du protéasome (APC/C) de par la liaison de la protéine cdc20 au motif D-box. Ceci entraine une accumulation préférentielle de la protéine lors des phases G1/S suggérant sa fonction dans la régulation de la transition G1/S. Nous avons isolé l'orthologue de RSS1 à partir de deux variétés tunisiennes de blé dur. Cette protéine orthologue, nommée TdRL1 (*Triticum durum* RSS1-like 1) présente au niveau de sa structure primaire toutes les caractéristiques de la protéine RSS1 à savoir des D-Box et un motif WAGE. Nous avons pu montrer que TdRL1 intervient dans l'amélioration de la tolérance des levures au stress salin et à la chaleur. Nous avons, en effet, sur-exprimé TdRL1 sous le contrôle d'un promoteur galactose dans des levures sauvage et des levures mutantes hypersensibles à la chaleur et au NaCl. Par rapport aux transformants contrôles (vecteur vide), les transformants sur-exprimant TdRL1 montrent une croissance accrue en conditions de stress. Pour comprendre le rôle de TdRL1 dans la tolérance des plantes aux stress abiotiques, nous avons transformé la plante modèle *Arabidopsis thaliana* par des constructions permettant la sur-expression de TdRL1 en fusion avec des étiquettes GFP, RFP, HA. Différentes lignées ont été obtenues qui sur-expriment TdRL1. Les premières analyses de certaines lignées montrent un accroissement du pouvoir germinatif en conditions de stress salin et ionique indiquant que TdRL1 participe à l'amélioration de la tolérance aux stress. D'autres analyses sont en cours pour confirmer cette première observation et pour mieux comprendre le rôle de TdRL1 dans la germination, l'amélioration de la croissance en conditions de stress. D'autres analyses physiologiques, cellulaires et moléculaires de ces lignées transgéniques sont en cours. Par ailleurs, RSS1 exercerait sa fonction en inhibant une protéine phosphatase de type 1, OsPP1a. Nous nous sommes ainsi attelés à isoler l'homologue TdPP1 à partir des variétés locales de blé dur. Une analyse phylogénétique complète des isoformes de PP1 de blé, de Brachypodium comparées à celles de riz et d'Arabidopsis nous a permis de montrer que TdPP1 est le plus proche orthologue de OsPP1a. TdPP1 est exprimé dans les racines et les feuilles de blé soumises à un stress et plus particulièrement induit dans les feuilles lors d'un stress salin uniquement. La forme recombinante de TdPP1 fusionnée à une étiquette 6xHis possède une activité phosphatase *in vitro* qui est stimulée par l'addition de Fer et de Manganèse. De plus, après expression transitoire dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* TdPP1 en fusion GFP est localisée de manière ubiquitaire dans les cellules épidermales montrant que cette protéine exerce sa fonction aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau. Enfin, l'expression de TdPP1 dans le mutant de levure *glc7*, mutant perte de fonction de l'unique phosphatase de type 1 a montré une complémentation partielle de phénotype de thermosensibilité du mutant *glc7 F256A* indiquant qu'in vivo TdPP1 est bien fonctionnelle.

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

Au cours de ces quinze dernières années, le paradigme « structure-fonction » a été remis en cause par la découverte des protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs), à savoir des protéines dépourvues de structure secondaire et tertiaire stables en conditions physiologiques de pH et salinité et en l'absence d'un partenaire ou ligand. Cependant, 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. Vue l'importance de ces protéines, on s'est intéressé à identifier, caractériser et répertorier les IDPomes de *O. sativa*, *Z. mays*, *S. bicolor*, *T. aestivum*, *H. vulgare* et *B. 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 *A. thaliana* révèle des résultats similaires avec les céréales étudiées. L'ensemble de ces données suggère que les plantes utilisent un mécanisme cellulaire commun pour l'adaptation aux contraintes environnementales. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives intéressantes d'un point de vue fondamental mais aussi d'un point de vue appliqué. L'originalité et les points forts de cette étude sont liés à sa multidisciplinarité par l'intégration des approches bioinformatiques, structurales et expérimentales. D'autant plus, Il s'agit d'une contribution originale dans la mesure où, à ma connaissance, une telle étude au niveau de protéomes n'a jamais été entreprise. En plus, les points suivants sont en cours de réalisation: i) Récupérer et prédire les IDPs à travers une étude *in silico* systématique et descriptive du désordre au sein des protèomes du blé et de l'orge, ii) Etendre l'examen des fonctions potentielles et les propriétés structurales du désordre chez les céréales, iii) Examiner le rôle des IDPs chez les céréales dans l'évolution d'une part et dans les interactions protéine-protéine d'autre part, iv) Récupérer et intégrer les résultats dans une base de données publique et accessible en ligne, dédiée aux IDPs chez les céréales. D'autre part, dans un travail ultérieur nous avons construit le réseau d'interaction des protéines WRKY qui est une IDP impliquée dans la tolérance au stress biotique et abiotique et l'immunité des plantes chez *A. thaliana.* Ainsi, on a identifié les hubs de ce réseau (Choura *et al*., 2015). Actuellement, on s'intéresse à i) Construire les réseaux de signalisation médiés par les WRKYs chez les céréales afin d'identifier les hubs potentiels impliqués dans différentes cibles intéressantes et chercher leurs homologues chez le blé et l'orge et ii) Valider expérimentalement les résultats trouvés dans ce qui a précédé en analysant leurs profils d'expression sous différents types de stress biotique et abiotique sur les variétés tunisiennes.

## **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

**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 jour la majorité des variétés améliorées de blé dur ont fait recours à « des génotypes fondateurs » déjà utilisés par les programmes internationaux d'amélioration comme ICARDA et CIMMYT. Ce projet et à travers ses différentes actions vise tout d'abord à former une collection du blé dur représentative du « germoplasme » Tunisien, la deuxième étape est la caractérisation de cette dernière de point de vue agronomique, morpho-physiologique, moléculaire et aussi évaluation de ses potentialités physicochimiques, technologiques, biochimique et pouvoir allergène. Ce projet permettra de valoriser certaines variétés locales écartées des programmes Tunisiens d'amélioration variétale du blé à cause de leurs faibles rendements. Au cours de l'année 2017 seulement certaines actions ont progressé Le développement de ce travail a nécessité la collaboration avec des institutions nationales, (ESAK Ecole Supérieure d'Agriculture de Kef ; Dr. Rhouma Sayar) et aussi internationales (Département Food and Drug, Université de Parme, Italie).

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

Au cours de la réalisation de ce projet, le premier problème rencontré est la disponibilité et l'authenticité du matériel végétal. C'est pourquoi deux années de ce projet ont été consacrées à la multiplication et l'épuration de certaines « variétés locales » et des variétés couramment utilisées par les agriculteurs afin de former le CBS « Durum Wheat Collection ». Cette collection sera le pilier de tout le travail durant ce contrat programme. Au cours de l'année 2017, cette collection a été enrichie par des accessions Tunisiennes de blé dur, récupérées de la banque de gènes de la Corée du sud. La tolérance de ces accessions vis-à-vis au stress salin a été étudiée par différentes techniques *in vitro* et aussi en plein champs. Ces variétés serviront pour des études de profil d'expression de certains gènes candidats associés à la tolérance au stress abiotique. Le but est le développement de marqueurs moléculaires fonctionnels pour la sélection variétale du blé dur en Tunisie.

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

Les marqueurs moléculaires SSRs, SNPs … sont la base de nombreuses études fondamentales portant sur la structure, le fonctionnement et l'évolution du génome de blé. En parallèles, ces marqueurs ont permis l'exploitation des ressources génétiques, l'identification des régions du génome portant des gènes d'intérêt et l'amélioration des variétés moyennant la sélection assistée par les marqueurs (MAS) et aussi l'assemblage des allèles favorables (Gene Pyramiding). Ainsi notre laboratoire s'est fixé, comme objectif pour ce contrat programme le développement de l'axe « marqueurs moléculaires» pour la caractérisation moléculaire du « germaplasme Tunisien » du blé dur, la sélection variétale et aussi l'identification des nouveaux gènes candidats pour la tolérance aux contraintes abiotiques. Cette action n'a pas avancé durant l'année 2017 faute de moyens financiers suffisants. En effet, pour le développement de cet axe, une liste de matériels a été établie depuis l'année 2016 et ceci dans le cadre du projet de collaboration bilatérale entre la Tunisie et la Corée du sud (TK/08/2012). Un rapport scientifique et financier de deux années d'exercice et une demande de reconduction pour la troisième année ont été envoyés au ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

**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 du blé dur, issues des programmes d'amélioration variétale (nouvelles variétés) et aussi des variétés locales. Durant l'année 2017, l'objectif de cette action était la détermination de l'impact des facteurs génétiques (effet génotype) et environnementaux (effet pluviométrie) sur les protéines allergènes du blé dur. Deux types de protéines allergènes ont été étudiés.

**3.1. Les protéines CM3 associés à l'asthme du boulanger** :

L'asthme du boulanger est une maladie professionnelle, assez grave, des voies respiratoires, due à une allergie aux farines de céréales et particulièrement à la farine de blé (Thillay, 2007). Ces protéines allergènes sont caractérisées par leur solubilité dans les solutions salines et les solutions chloroforme/ méthanol, d'où leur nomenclature protéines CM (Shewry et al., 1984). Les protéines CM3 sont identifiées comme allergènes associés à l'asthme de Boulanger. Une collection du blé dur (100 accessions) représentant un siècle de blé dur en Tunisie, contenant des variétés nouvelles, anciennes et locales, a été mise en culture durant trois saisons agricoles au niveau de la station expérimentale de l'ESAK. L'analyse de variance a montré une grande variabilité intra-groupe et intergroupe dans le

teneur en peptides pathogènes générés. Le spectre de quantification en peptides allergènes est assez large. En effet, la contenance en ces derniers varie de 91ppm à 2657ppm. Certaines variétés locales, portant le même nom, présentent des valeurs variables selon les accessions (exemple pour la variété locale Hmira et les différentes accessions Hmira1, Hmira2 et Hmira3, les valeurs étaient respectivement de 158,2ppm, 702,4ppm et 296,4ppm). Une variabilité génétique pourrait être derrière cette variabilité du potentiel allergène de ces accessions. L'analyse combinée de la variance des données a révélé un effet important du génotype, de l'année de récolte et de leur interaction. Les protéines allergéniques CM3 varient significativement entre les génotypes étudiés, comme confirmé par la variabilité génétique, le coefficient de la variance, de l'héritabilité et du progrès génétique.

### 3.2. Les peptides impliqués dans la maladie cœliaque

La maladie cœliaque (CD), ou intolérance au gluten, est de nos jours une des maladies digestives les plus fréquentes. Sa connaissance a beaucoup progressé durant ces vingt dernières années mais le seul traitement connu reste l'éviction totale du gluten de l'alimentation. La maladie cœliaque est une intolérance permanente à une ou plusieurs fractions protéiques du gluten. Cette réponse est activée par certains peptides dérivés de gluten (PSQQ, QQQP, QPYP and QQPY). L'impact de programmes d'amélioration variétale sur le pouvoir allergène (associé aux maladies céliaques), du gluten du blé n'a pas été très étudié à l'échelle internationale et aussi nationale. L'objectif de cette action était la quantification des peptides impliqués dans la maladie cœliaque en utilisant un modèle de digestion *in vitro* capable d'imiter les peptides générés dans le tractus gastro-intestinal humain. Les analyses des résultats obtenus ont montré une grande variabilité dans le contenu en peptides immunogènes et toxiques reflétant une diversité génétique élevée dans le « germaplasme du blé dur » cultivé en Tunisie durant le dernier siècle dernier. Notre étude a aussi montré une variabilité importante dans les épitopes responsables de la maladie céliaques selon les conditions climatiques (la pluviométrie).

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

### 1/ Etude des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant Protein) : Exemple de la famille ASR (Abscisic acid, Stress and Ripening)

L'étude de la réponse des plantes face à différents contraintes abiotiques, principalement la salinisation, la sécheresse et les températures extrêmes, est essentielle pour comprendre les voies de signalisation qui aboutissent au phénotype de la tolérance et la résistance. Ces voies de signalisation nécessitent l'expression d'un réseau de gènes régulateurs et des gènes effecteurs. LEA est considérée parmi les protéines impliquées et associées à la tolérance des contraintes biotiques et abiotiques que subissent les plantes. ASR (**A**bscisic acid, **S**tress and **R**epening) est une famille de gènes, associée à la tolérance au déficit hydrique, à la salinité et aussi impliquée dans l'adaptation des plantes aux climats arides (Frankel et al., 2003). Les protéines correspondantes à cette famille de gènes, ont été classées comme un nouveau group (septième group) de la supère famille des LEA protéines « Late Embryogenesis Abundant » (Battaaglia et al., 2008). Le rôle de cette famille de protéine reste encore ambigu malgré cette classification. Certains auteurs suggèrent que les ASRs jouent double rôle dans la protection et tolérance des plantes aux stress abiotiques et même biotiques (Saumonneau et al. 2012). D'une part, ces protéines assurent la protection des protéines cellulaires de la dénaturation grâce à une activité chaperonne. D'autre part, cette famille de protéines assure un rôle de facteur de transcription régulant l'expression de gènes ayant une relation directe ou indirecte avec la tolérance au stress. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons, en premier temps, isolé les ADNc de l'homologue de l'ASR chez l'orge (HvASR1) et le blé dur (TtASR1). Vue la relation étroite entre la structure et la fonction, et aussi pour mieux comprendre la multifonctionnalité des protéines ASR, une étude

structurale des protéines HvASR1 et de TtASR1, a été menée en collaboration avec le laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules biologiques (Université Aix-Marseille, CNRS UMR7257). Dans cette étude et grâce au programme de prédiction le méta server MeDor, les deux protéines HvASR1 et TtASR1 sont prédites être désordonnées. Ensuite sur la base des outils biophysiques, il a été démontré que les deux protéines HvASR1 et TtASR1 sont des protéines désordonnées dépourvues d'une structure secondaire et tertiaire stable, ils sont hypersensibles à la protéolyse limitée et ils possèdent des paramètres hydrodynamiques et des profils de diffusion SAXS (Small Angle X-ray Scattering) des protéines intrinsèquement désordonnées. En outre, la distribution de rayon de giration (Rg) des sous-ensembles sélectionnés de HvASR1 et TtASR1 suggère l'existence de deux populations différentes caractérisées par une taille moyenne différente (Fig. 4). Ces données peuvent expliquer leurs flexibilités et leurs plurifonctionnalités. En effet, au cours de ce travail, nous avons remarqué que TtASR1 fait partie du groupe des PID (Protein Intrinsically Disordered) possédant des structures secondaires résiduelles (PMG Pre-Molten Globule) alors que HvASR1 a été caractérisée comme presque entièrement désordonnées. Cette différence structurale entre les deux protéines pourrait expliquer la différence fonctionnelle observée. Il a été aussi démontré que la chaleur induit une transition structurale et un repliement des deux protéines HvASR1 et TtASR1. Ceci pourrait être derrière l'effet chaperonne et la tolérance des souches bactériennes exprimant ces protéines à 50°C. Les analyses par CD, en présence de glycérol, ont montré que la dessiccation déclenche un gain en structure secondaire de HvASR1 et TtASR1. L'addition d'ions $Zn^{2+}$ déclenche un changement de conformation de HvASR1 et TtASR1 comme a été montré pour les ASRs de tomate et du banane (Dai et al., 2011; Goldgur et al., 2007).

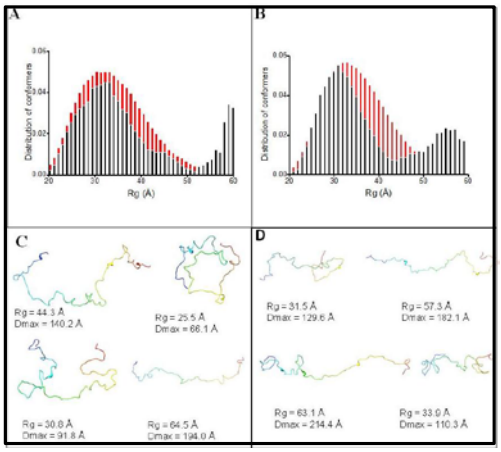



**Figure 4 :** Distribution de Rayon de giration de l'ensemble des conformères de HvASR1 (A) et TtASR1 (B) générés de manière aléatoire (rouge) et du sous-ensemble de conformères sélectionnés utilisant le programme GAJOE (noir). Représentation de certains membres du sous-ensemble conformationnel final de HvASR1 (C) et TtASR1 (D). Les modèles montrent certains des conformations sélectionnés à différentes valeurs de Rg et Dmax, soulignant la présence d'hélices α courtes. Les chaînes sont colorées du N-terminal (bleu) au C-terminal (rouge).

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

La réponse aux stress biotiques et abiotiques chez les plantes est un phénomène très complexe, dont la cascade de réactions fait intervenir un grand nombre d'enzymes et de composés, qu'ils s'agissent de protéines ou de molécules de signalisation. Parmi eux, les protéines de transfert de lipides (LTP, lipid transfer protein) jouent un rôle primordial. En outre, plusieurs LTPs ont été décrites comme des allergènes pertinents du pollen et d'aliments végétaux. Dans le cadre de cette action, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une protéine de transfert de lipides de blé dur (TdLTP4) pour investiguer en premier lieu son rôle dans l'amélioration de la tolérance au stress et en deuxième lieu,

pour évaluer son potentiel allergénique. L'étude de l'activité GUS chez des plantes exprimant la région promotrice du gène TdLTP4 fusionnée avec le gène rapporteur GUS, a montré que le promoteur pTdLTP4 est fonctionnel et il est fortement induit en réponse au stress. Des tests d'ImmunoCAP et d'inhibition croisée réalisés sur des sérums de 39 individus bien caractérisés et sensibilisés au blé, ont témoigné que TdLTP4 confère une importante capacité de liaison aux IgE des sérums des patients allergiques comme elle présente une forte réactivité croisée avec l'allergène majeur Pru p 3. Tous ces résultats suggèrent d'une part que la protéine TdLTP4 est fortement impliquée dans l'amélioration de la tolérance aux stress chez les plantes. D'autre part, selon les définitions du sous-comité de la nomenclature des allergènes IUIS, TdLTP4 (Tri d 14) est qualifiée comme allergène principal du blé.

## Publications Internationales parues en 2017

**1-** Feki K, Tounsi S, Masmoudi K, Brini F (2017) The durum wheat plasma membrane $Na^+/H^+$ antiporter SOS1 is involved in oxidative stress response. *Protoplasma*, 254 :1725-1734.

**2-** 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.

**3-** 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* 137: 128-141

**4-** Tounsi S, Feki K, Hmidi D, masmoudi Kh, Brini F (2017) Salt stress reveals differential physiological, biochemical and molecular responses in *T. monococcum* and *T. durum* wheat genotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3):517-523.

**5-** Ben Saad R, Farhat-Khemekhem A, Ben Halima N, Ben Hamed K, Brini F, Saibi W (2017) The LmSAP gene isolated from the halotolerant *Lobularia maritima* improves salt and ionic tolerance in transgenic tobacco lines. *Functional Plant Biology,* https://doi.org/10.1071/FP17202

**6-** Feki K, Tounsi S, Brini F (2017) Comparison of an antioxidant system in tolerant and susceptible wheat seedlings in response to salt stress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15 (4), e0805. https://doi.org/10.5424/sjar/2017154-11507.

**7-** Sahnoun M, Bejar S, Daoud L, Ayadi L, Brini F, Saibi W (2017) Effect of Agave americana L. on the human, and Aspergillus oryzae S2 α-amylase inhibitions. Natural Product Research, doi.org/10.1080/14786419.2017.1408094

**8-** Choura M, Rebaï A (2017). Exploring charged biased regions in the human proteome. *J Recept Signal Transduct Res*. 37(4): 386-390.

**9-** Ghneim-Herrera T, Selvaraj MG, Meynard D, Fabre D, Peña A, Ben Romdhane W, Ben Saad R, Ogawa S, Rebolledo MC, Ishitani M, Tohme J, Al-Doss A, Guiderdoni E, Hassairi A. (2017) Expression of the Aeluropus littoralis AlSAP Gene Enhances Rice Yield under Field Drought at the Reproductive Stage. *Frontier Plant Science.* 12, 8-994.

**10**- Walid Ben-Romdhane, Rania Ben-Saad, Donaldo Meynard, Jean-Luc Verdeil, Jalel Azaza, Nabil Zouari, Lotfi Feki, Emmanuel Guiderdoni, Abdullah Al-Doss and Afif Hassairi (2017). Ectopic Expression of *Aeluropus littoralis* Plasma Membrane Protein Gene *AlTMP1* Confers Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Tobacco by Improving Water Status and Cation Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences.* 24, 18-4.

**11-** Manel Boudabbous, Walid Saibi, Zouhaier Bouallagui, Mosbeh Dardouri, Sami Sayadi, Hafedh Belghith, Tahar Mechichi and Ali Gargouri. (2017) "A fast activated-charcoal pre-purification of Fusaruim solani β-glucosidase for an efficient oleuropein bioconversion". Preparative Biochemistry and Biotechnology 47 185-191

**12-** Manel Boudabbous, Ines Ben Hmad, Walid Saibi, Mariem Mssawra, Hafedh Belghith and Ali Gargouri. (2017) «Trans-glycosylation capacity of a highly glycosylated multi-specific β-glucosidase from Fusarium solani». Bioprocess and Biosystems Engineering 40 559-571

**13-** Fatma Boukid, Barbara Prandi, Stefano Sforza, Rhouma Sayar, Yong Weon Seo, Mondher Mejri, and Ines Yacoubi (2017) Understanding the Effects of Genotype, Growing Year and Breeding on Tunisian Durum Wheat Allergenicity (Part 1): The Baker's asthma case. Journal of Agriculture and Food Chemistry, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02040

**14-** Marwa Harbaoui, Rania Ben Saad, Nihed Ben Halima, Mouna Choura and Faical Brini (2017) Structural and functional characterisation of two novel durum wheat annexin genes in response to abiotic stress. Functional Plant Biology, doi.org/10.1071/FP17212.

**15-** Karama Hamdi, Edoardo Salladini, Darragh P. O'Brien, Sébastien Brier, Alexandre Chenal, Ines Yacoubi, and Sonia Longhi. (2017) Structural disorder and induced folding within two cereal, ABA stress and ripening (ASR) proteins. *Sci Rep.* 2017; 7: 15544.

**16-** Hatem Boubakri, Ahmed Jdey, Amani Taamalli, Wael Taamalli, Moez Jebara, Faiçal Brini, Ylenia Riciputi, Federica Pasini, Magné Christian, and Vito Verardo (2017) Phenolic composition as measured by liquid chromatography/ mass spectrometry and biological properties of Tunisian barley. International Journal of Food properties, https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1359186

**17-** Domenica Nigro, Stefania Fortunato, Stefania Lucia Giove, Giacomo, Mangini, Ines Yacoubi, Rosanna Simeone, Antonio Blanco and Agata Gadaleta (2017) Allelic Variants of Glutamine Synthetase and Glutamate Synthase Genes in a Collection of Durum Wheat and Association with Grain Protein Content. Diversity 9(4), 52.

### Chapitres d'ouvrage

**1-** Brini F (2017) Photosynthesis Under Stressful Environmental Conditions: Existing Challenges. Book entitled ''Environment and Photosynthesis: A Future Prospect'' Chapter 5, pp 68-91.

### Brevets nationaux d'invention déposés en 2017:

**1-**Mouna Sahnoun, Walid Saibi, Trabelsi Sahar et Samir Bejar. « L'effet hypoglycémiant de l'extrait de l'Agave americana et de l'acide p-coumarique y compris celui extrait de cette plante via leur fort effet inhibiteur de l'alpha amylase humaine » INNORPI : Tn2017/0056.

### Projets de coopération acceptés en 2017

1/Programme Jeune Enseignants Chercheurs Edition 2017 (*18PJEC06-02)* Intitulé : Etude des protéines intrinsèquement désordonnées chez les céréales.

### Conventions avec des partenaires scientifiques et socio-économiques

**- 2017 : Convention 1** : LBAP, CBS/LPE, CBBC : ''Isolement de gènes candidats pour la réponse au stress salin à partir de la plante halophyte *Lobularia martima* : Etude fonctionnelle chez la levure et chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*''

**- 2017** : **Convention 2** : LBAP, CBS/ LL, CBBC : « Etude de la famille des thiorédoxines de type h (Trxs h) et leur valorisation dans l'amélioration de la qualité germinative et technologique des graines de blé dur et des légumineuses ».

**- 2017** : **Convention 3** : LBAP, CBS/ LL, CBBC : « Amélioration des rendements des cultures associées, légumineuses-Céréales sous contraintes biotiques et abiotiques ».

### Séminaires, journées et ateliers scientifiques

-Organisation d'un Workshop dans le cadre du projet TUNGER, et ce le 21/11/2017 au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) : Intitulé du Workshop: ''LIPID TRANSFER PROTEIN (LTP): AN INTERFACE BETWEEN PLANT DEFENCE AND HUMAN ALLERGY''.

### Thèses Soutenues en 2017:

- **Sana Tounsi :** soutenue le 06/02/2017 à la FSS
- **Héla Safi :** soutenue le 18/11/2017 à l'ENIS

### Mastères Soutenus en 2017:

- **Harzalli Sawsan** (05/12/2017) à la FSS
- **Hajer Ziadi** (06/12/2017) à la FSS
- **Basma Azzouzi** (07/12/2017) à la FSS
- **Marwa BOUHLEL** (11/12/2017) à la FSS
- **Hanen Kammoun** (12/12/2017) à la FSS

# 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

### Corps A

| Grade | Nom et prénom | Etablissement | Université |
|---|---|---|---|
| **Professeurs** | MELLOULI Lotfi | CBS | Sfax |
| | CHOUAYEKH Hichem | CBS | Sfax |
| | KAMMOUN Radhouane | ISBS | Sfax |
| **Maitres de conférences** | BEN SALAH Riadh | CBS | Sfax |

### Corps B

| Grade | Nom et prénom | Etablissement | Université |
|---|---|---|---|
| **Maitres assistants** | SMAOUI Slim | CBS | Sfax |
| | KARRAY-CHOUAYEKH Sondes | ISEP-BG Soukra | Tunis |

### Cadres Techniques

| Grade | Nom et prénom | Etablissement |
|---|---|---|
| Ing. En Chef | REBAI-KARRAY Ines | CBS |
| Ing. Principal | HAMMAMI-BLIBECH Monia | CBS |
| Ass.App.Rech.Princ | Kameleddine Bouchaala | CBS |

### Docteurs (Postdoc)

| Nom et prénom | Qualité | Etablissement |
|---|---|---|
| FARHAT-KHEMAKHEM Ameny | Post-doc | LMB-CBS |
| CHAKCHOUK-MTIBAA Ahlem | Post-doc | LMB-CBS |
| KRIAA Mouna | Post-doc | LMB-CBS |
| TRABELSI-KANOUN Imen | Post-doc | LMB-CBS |
| BOUKHRIS- CHOUAYEKH Ines | Post-doc | LMB-CBS |
| SELLEM Imen | Post-doc | LMB-CBS |
| BAYAR Nadia | Post-doc | LMB-CBS |
| BEN SLIMA Sirine | Post-doc | LMB-CBS |
| BEN YOUSSEF NAJAH Soumaya | Post-doc | LMMA-Paris-France |

**Doctorants**

| Nom et prénom |
|---|
| KAANICHE Fatma |
| BEN RHOUMA-ABBES Marwa |
| BEN NASR Yosri |
| CHOUIKHI Aicha |

## 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 2017.***

## ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

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

***Personnel impliqué***: Pr. Lotfi MELLOULI; Dr. Slim SMAOUI; Dr. Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA (Postdoc); Dr. Soumaya NAJAH-BEN YOUSSEF (Postdoc); Dr. Imen SELLEM (Postdoc); Mme Ines KARRAY-REBAI (Ing en. chef); Mr. Kameleddine BOUCHAALA (Ass. App. Rech.); Melle Fatma KAANICHE (doctorante).

**Situation du projet:** Ce projet de recherche vise deux objectifs principaux: Le premier 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, consiste à détecter et analyser les clusters de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de quelques métabolites secondaires biologiquement actifs à savoir les biomolécules de la famille des rhamnopyranosides.

### II. 1. 1. Biomolécules de *Streptomyces*

***Souche TN82 :***

- Isolement et sélection d'une souche bactérienne actinomycètes à partir d'un échantillon de sol du Sahara Tunisien. Après identification morphologique et moléculaire et étude phylogénique, nous avons démontré qu'il s'agit d'une nouvelle bactérie du genre *Streptomyces* qui a été désignée *Streptomyces* sp. TN82.
- Optimisation des conditions de culture pour une sécrétion optimale des biomolécules par cette souche
- Extraction et purification (par le biais de plusieurs techniques chromatographiques) de six biomolécules pures à partir d'une fermentation de 15 litres de la souche *Streptomyces* sp. TN82.
- Caractérisation de la structure chimique de ces six biomolécules tout en utilisant plusieurs techniques spectroscopiques. **M1**: 3-phenylpyrazin-2(1H)-one (1); **M2**: 3-Omethylviridicatin; **M3**: cyclo-(Leu, Pro); **M4**: anthranilic acid; **M5**: indole-3-carbaldehyde et **M6**: p-hydroxybenzoic. Pour la biomolécule **M1**, elle est décrite pour la première fois comme une biomolécule naturelle. Cette molécule bioactive pure présente une concentration minimale inhibitrice (CMI) contre le pathogène *Listeria .monocytogenes* deux fois et douze fois inférieure qu'à celle de l'ampicilline et la kanamycine respectivement.

***Souche TN71:***

- Les études d'identification morphologique, moléculaire et phylogénique, nous ont permis de déduire qu'il s'agit d'une nouvelle bactérie du genre *Streptomyces* qui a été désignée *Streptomyces* sp. TN71. Cette dernière a été sélectionnée pour sa capacité de secréter des biomolécules ayant des activités inhibitrices notamment contre des espèces fongiques de *Fusarium* sp., et *Agrobacterium tumefaciens*.
- Pour l'optimisation du milieu de culture pour une sécrétion maximale des biomolécules par la souche de *Streptomyces* sp. TN71, nous avons adopté les techniques de plans d'expériences (Plackett-Burman, Box-Benhken) et réseau de neurones artificiels

### II. 1. 2. Biomolécules de plantes

Préparations et analyses de plusieurs extraits de plantes et de quelques huiles essentielles. Pour la partie aérienne de la plante *Inula graveolens* (qui pousse en milieu salin dans la région de la Chebba-Mehdia), nous avons préparé six extraits (cyclohexane, dichloromethane, acétate d'éthyle, acétone, acétonitrile et aqueux) et nous avons étudié les activités biologiques (antibactériennes, antifongiques, antioxydantes, anti-cholinestérase «AChEI» et anti-tyrosinase «TyrEI») de ces différents extraits:

- L'extrait cyclohexane présente une importante activité antifongique notamment contre *Candida tropicalis* et *Candida albicans*
- L'extrait acétate d'éthyle possède la meilleure activité contre les bactéries à Gram négatif

- Les extraits cyclohexane et dichloromethane présentent une CMI contre le pathogène *Listéria monocytogenes* de 0,0312 mg/ml égale à celle de l'ampicilline
- L'extrait acétone possède la meilleure activité AChEI et l'extrait acétate d'éthyle la meilleure activité TyrEI

### II. 1. 3. Voies de biosynthèse des acyl-rhamnopyranosides de la souche de *Streptomyces* TN58

Dans des travaux antérieurs, nous avons purifié et caractérisé à partir de la souche de *Streptomyces* TN58, deux biomolécules de la famille des acyl-rhamnopyranosides ayant des activités anticancéreuses. Il s'agit du 2-aminobenzoyle α-L-rhamnopyranoside et du 4-hydroxybenzoyle α-L-rhamnopyranoside. Au cours de l'année écoulée et en utilisant les techniques de purification en DEDL (Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière), nous avons détecté, purifié et caractérisé chimiquement une troisième biomolécules de la famille des rhamnopyranosides à partir du surnageant bioactif de la souche de *Streptomyces* TN58. C'est la biomolécule phényle-acétyle-rhamnopyranoside (**Figure 1**).
Concernant l'organisation des gènes de biosynthèses de ces trois rhamnopyranosides, les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit:

- Les quatre ORFs rhaA (gène dTDP-glucose-4,6-déhydratase);

rhaD (gène dTDP-glucose synthase); rhaC- (gène cétoréductase)
et rhaB (gène épimérase) constituent la voie de biosynthèse du sucre rhamnose et elles sont impliquées dans la biosynthèse des trois acyl-rhamnopyranosides secrétées par la souche de *Streptomyces* TN58.

- Dans les voies de biosynthèses de ces trois biomolécules il n'ya pas d'implication de glycosyl transférases (situation originale).
- Les gènes des voies de biosynthèses de ces trois biomolécules ayant une activité anticancéreuse ne sont pas groupés en cluster mais ils sont éparpillés sur le chromosome (situation inhabituelle)

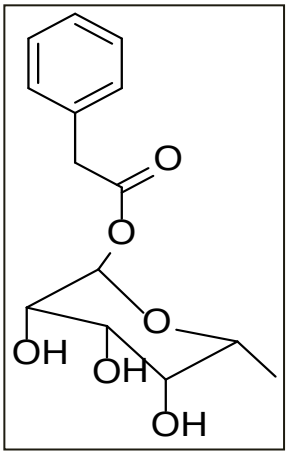



**Figure1**. Structure chimique de la biomolécule phényle- acétyle-rhamnopyranoside

### II. 2. <u>Projet 2.</u> (Responsable Pr. Hichem CHOUAYEKH) : «Enzymes et bactéries vecteurs d'activités enzymatiques en nutrition/santé animale»

***Personnel impliqué***: Pr. Hichem CHOUAYEKH ; Dr. Riadh BEN SALAH (M.C) ; Dr. Ameny FARHAT-KHEMAKHEM (postdoc); Dr. Ines BOUKHRIS (postdoc); Mme Monia BLIBECH-HAMMAMI (Ingénieur principal).

#### II.2.1. Les phytases

Les phytases catalysent la déphosphorylation séquentielle des phytates pour générer du phosphate inorganique (Pi), des dérivés du *myo*-inositol phosphate et les minéraux liés à la molécule de *myo*-inositol phosphate.

**Etude des relations structure fonction de la phytase PHY US417:** Dans un travail antérieur, nous avons montré que la phytase PHY US573 est légèrement plus thermostable que la phytase TS-Phy considérée jusqu'à présent comme étant l'enzyme la plus thermostable. Ces deux enzymes ne diffèrent que par 5 résidus. L'étude structurale comparative des modèles des deux enzymes a révélé que seulement le résidu à la position 346 jouerait un rôle important

dans la thermostabilité des phytases de *Bacillus*. Par ailleurs, l'alignement des séquences de plusieurs phytases de *Bacillus* a révélé une possible implication des résidus aux positions 292 et 361 dans la thermostabilité des phytases de *Bacillus*. Ainsi, pour étudier le rôle potentiel de ces 3 résidus, nous avons généré les mutants suivants (A346V; K292Q; Q361K) chez la phytase PHY US417 qui est nettement moins thermostable que PHY US573 et TS Phy. Le clonage de ces trois gènes mutés dans le vecteur d'expression pMSP3535 utilisé pour l'expression du gène *phy* US417 sauvage est en cours.

**Etude de l'effet de la phytase PHY US573 extrêmement tolérante aux sels sur la croissance des plantes d'*Arabidopsis* en présence d'acide phytique et de NaCl.** En raison de sa forte tolérance aux sels, nous avons étudié le potentiel d'application de la phytase PHY US573 (Boukhris *et al.*, 2015) pour promouvoir la croissance *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana* cultivée en présence d'acide phytique et de NaCl en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (LBAP-CBS). Pour ce faire, des graines d'*Arabidopsis* ont été mises à germer sur milieu MS contenant les éléments minéraux nécessaires à la croissance de ces plantules. Une fois enracinées, les plantules ont été transférées sur les milieux de croissance suivants avec ou sans NaCl à la concentration de 100 mM: milieu MS standard; MS-P (milieux MS sans phosphate) ; MS-P+AP (milieu MS sans phosphate additionné d'acide phytique à une concentration finale de 0,33 mM) ; MS-P+AP+ PHY US573 (milieu MS sans phosphate contenant 0,33 mM d'acide phytique et la phytase PHY US573 à une concentration finale de 26 U/ml). Nous avons ainsi pu démontrer pour la première fois, la capacité de la phytase PHY US573 extrêmement tolérante aux sels à mobiliser et augmenter la biodisponibilité du P-phytique pour les plantes d'*A. thaliana* cultivées dans des conditions de forte salinité en présence d'acide phytique comme source unique de P.

**Etude de l'activité antibactérienne de l'acide phytique (substrat des phytases).** Dans le cadre d'un travail récemment initié, nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'acide phytique par la détermination de la CMI contre des bactéries à Gram$^+$ (*S. aureus*, et *L. monocytogenes*) et à Gram$^-$ (*S. typhimurium*, *E. coli*, A. *tumefaciens* et *P. aeruginosa*). Nous avons démontré pour la première fois que l'acide phytique possède une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries pathogènes (effet bactéricide contre *Listeria monocytogenes*) y compris *des* souches pathogènes multi résistantes.

**Etude de la possibilité de synergisme entre les δ-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* et l'acide phytique.** Dans le cadre d'une investigation préliminaire récemment initiée, nous avons démontré pour la première fois une synergie entre les δ-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* et l'acide phytique en poudre ajoutée à 1%. Cette synergie se traduit par une mortalité précoce et plus importante des larves d'*Ephestia kuehniella* (taux de mortalité de 70% après 7 jours d'incubation contre 33,33% pour les δ-endotoxines de *B. thuringiensis* seules). L'analyse histologique a révélé des dommages sévères de l'épithélium et qui sont plus prononcés que ceux observés pour les larves traitées avec les bioinsecticides de *Bt* seuls. Par son activité antioxydante maximale à la concentration 1%, l'acide phytique allègerait le stress oxydatif induit lors de l'intoxication par les bioinsecticides de *Bt* ce qui rendrait les larves d'insectes moins stressés et favoriserait d'avantages la fixation des δ-endotoxines sur leurs récepteurs et par conséquence la formation accrue de pores entraînant cette mortalité très importante et bien précoce. Ces résultats seront confirmés dans le cadre d'une étude qui sera réalisée en 2018.

**Détermination des effets de la supplémentation de la souche *Bacillus amyloliquefaciens* US573 sur les performances de croissance ainsi que la morphologie et la microflore intestinale du poisson d'élevage *Dicentrarchus labrax*.** La souche *B. amyloliquefaciens* US573 productrice de phytase possède un gros potentiel d'application comme probiotique dans l'industrie de la volaille (Farhat-Khemakhem *et al.*, 2017). Pour élargir le spectre de son utilisation, dans la présente étude, nous avons cherché à déterminer les effets de la supplémentation de US573 (à $10^7$ UFC / g d'aliment) en tant que probiotique vecteur d'activités enzymatiques sur les performances de croissance ainsi que la morphologie intestinale et la microflore de *Dicentrarchus labrax*. L'étude de la morphologie et de l'histologie intestinale a révélé une augmentation du nombre de cellules caliciformes (impliquées dans la synthèse du mucus qui joue un rôle important dans le mécanisme de défense immunitaire innée) au jour j21 chez les poissons traités avec la souche *B. amyloliquefaciens* US573 pas rapport aux poissons témoins. Cette abondance de cellules caliciformes peut conférer une meilleure immunité aux parasites puisque, au jour j42, la présence de ces agents a été détectée uniquement dans les villosités et le muscle intestinal des poissons alimentés par le régime témoin. De plus, la longueur des villosités (permettre une augmentation de la surface d'absorption et une amélioration de l'utilisation des nutriments) a été significativement augmentée dans l'intestin des poissons nourris avec un régime complémenté avec la souche probiotique. Par ailleurs, la quantification du nombre de copies gènes ARNr 16S bactériens/g d'intestin a révèlé que l'intestin provenant de poissons nourris avec *B. amyloliquefaciens* US573 contiendrait une microflore plus abondante dont la composition sera étudiée par séquençage à haut débit. Nos résultats ont montré que la supplémentation de la souche US573 peut constituer une approche efficace pour un élevage durable du poisson *Dicentrarchus labrax*.

### II.2.2. 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. Pour ceci, la β-mannanase est ajoutée pour digérer les mannanes, améliorer le taux de conversion de l'aliment et les performances de croissance.

Dans un travail antérieur, suite à un criblage, nous avons sélectionné 5 souches nommées US134, US150, US176, US180 et US191 produisant une activité mannanase extracellulaire. La souche US191 a été identifiée en tant que *Bacillus subtilis* US191. Pour les autres souches US134, US150, US176 et US180 (séquences des gènes ARNr 16S incomplètes) elles appartiennent également au genre *Bacillus*. Les gènes mannanases des 5 souches ont été clonés et séquencés. L'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques a montré de très fortes homologies avec des gènes de mannanases issus de *Bacillus*.

En 2017, en vue de surproduire la mannanase Man US191 de la souche *Bacillus subtilis* US191, le gène *man US191* correspondant à la mannanase mâture a été cloné dans le vecteur d'expression pET 28b et exprimé chez *E. coli* BL21(DE3). L'optimisation des conditions de culture et d'induction en vue de surproduite l'activité mannanase a été réalisée en milieu liquide contenant du locust bean gum (LBG) à 0.3% comme substrat. En plus, le gène *man US191* a été cloné dans un vecteur d'expression pour *Bacillus subtilis* appelé pBSMul2. La transformation de la souche *Bacillus subtilis* TEB1030 par compétence naturelle avec le plasmide recombinant est en cours d'optimisation.

Par ailleurs, nous avons optimisé les conditions de production de mannanase Man US191 par la souche *Bacillus subtilis* US191 moyennant la méthodologie des plans d'expérience. Ceci a permit d'atteindre un niveau de production de mannanase de 4,16 U/ml.

Enfin, nous avons évalué les propriétés probiotiques des cinq souches US134, US150, US176, US180 et US191sélectionnées pour la production de β-mannanases extracellulaires. Ceci nous a permit de sélectionné la souche US191 comme candidat prometteur pour application comme « direct-fed microbial » en alimentation animale.

### II. 3. Projet 3. (Responsable Dr. Riadh BEN SALAH). : «Production et Formulation de biofilms bactériens en agroalimentaire»

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

Notre intérêt s'est porté à étudier l'effet de la substitution du nitrite par la souche probiotique TN8, sur la qualité microbienne, la stabilité physico-chimique, et le profil textural des saucisses fraîches durant le stockage à 4°C.

Les résultats ont montré que la substitution du nitrite par la souche probiotique, a assuré l'amélioration de la qualité microbiologique des saucisses fraîches durant le stockage à 4°C. En effet, par comparaison avec l'échantillon contrôle, nous avons constaté une conservation de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), une augmentation des bactéries lactiques et une réduction de la croissance des bactéries pathogènes *L. monocytogenes* ATCC 19117 et *S.typhimurium* ATCC 14028.

De plus, nous avons montré que la substitution du nitrite par la souche probiotique diminue la valeur du pH et la couleur sans gêner l'opinion des consommateurs. Ainsi, cette substitution conserve la stabilité oxydative des saucisses.

Les résultats obtenus ont montré, également, que la présence de souche probiotique, a permis d'améliorer de façon très nette les paramètres texturaux (la cohésion, l'adhésion, l'élasticité la dureté, la masticabilité et la rigidité) des saucisses fraîches durant le stockage à 4°C. Cette particularité fait que la souche probiotique est capable de substituer le nitrite, qui est un conservateur chimique, afin d'être appliquée dans la bioconservation des dérivés de viande.

La deuxième partie de ce travail a eu comme objectif de trouver une méthode pour obtenir des saucisses (merguez) économiques et saines afin de substituer la viande hachée de bœuf par les fibres végétales en ajoutant les souches probiotiques. La substitution d'une partie de la viande par un mélange de fibres constitué de la fibre de bambou et de la fibre de carotte montre un gain de l'incorporation des viandes de bœuf allant jusqu'à 10,5% sans altérer la qualité du produit fini (Merguez). En deuxième lieu, la formulation dans laquelle on a substitué une partie de la viande hachée de bœuf (réduction de la viande de 25% à 10,5%) par la fibre BBC est retenue en incorporant les souches probiotiques, *L. plantarum* TN8 et *P. acidilactici* dans le Merguez. Ainsi, une quantité de viande de bœuf 'à 15% nous permet d'obtenir une formulation ayant des caractéristiques similaires au témoin au niveau de la fermeté et approximativement similaires telles que la perte de l'eau au cours de la cuisson et du processus mais une amélioration au niveau des propriétés sensorielles. Mais, il est possible de substituer la viande hachée de bœuf par la fibre BBC, puisque cette formulation présente des caractéristiques légèrement différentes avec le témoin avec une amélioration dans l'acceptabilité générale. Ainsi, la combinaison de la fibre BBC avec deux souches probiotiques, a un effet très bénéfique sur l'amélioration de la qualité microbiologique des saucisses fraîches durant le stockage à 4°C.

De plus, nous avons constaté que cette combinaison (BBC et les deux souches probiotiques) améliore le paramètre textural du produit nouvellement formulé par rapport au contrôle et aux échantillons dans lesquelles on a incorporé les souches séparément.

Les résultats obtenus ont, également, montré qu'à la fin de la période du stockage, les saucisses avec différentes souches probiotiques ont affiché une diminution du paramètre de couleur b*

L'addition des deux souches a un effet très bénéfique sur les paramètres sensoriels, exceptionnellement sur la couleur et l'acceptabilité générale. Pour cela, on a l'intérêt de construire des modèles de régression afin de prédire l'acceptabilité générale. Cette particularité fait que la symbiotique est une méthode prometteuse d'améliorer la qualité hygiénique et les caractéristiques sensorielles des saucisses

Dans une troisième partie, nous avons étudié les donnée structurales, les caractéristiques physico-chimiques, fonctionnelles et effets antioxydants de polysaccharide extrait à partir des graines de Sorgho, nommée PSS, et son application comme un antioxydant dans le salami.

Le PSS présente un rendement d'extraction intéressant qui est de l'ordre 15,9%, une teneur en carbohydrates de 78% et une masse moléculaire égale à 68 kDa. La composition du PSS analysé par CCM et HPLC a révélé qu'il est composé, seulement, de molécules de glucose. L'analyse du PSS par rayon X a montré que le PSS est un polymère semi-cristallin.

A partir des études des propriétés fonctionnelles, il ressort que le PSS possède de bonnes propriétés émulsifiantes vis-à-vis de l'huile de maïs même après 168 h (61,5 ± 0,02%). Il présente des pouvoirs de rétention d'eau et d'huile de l'ordre de 3,01 ± 0,03 et 1,02 ± 0,03 g/g, respectivement.

De plus, à la lumière des résultats obtenus concernant l'activité antioxydante du PSS évaluée *in vitro* (test au DPPH, test à l'ABTS, test d'inhibition de blanchiment du β-carotène et test d'activité antioxydant totale), il est en ressort que ce biopolymère apporte un potentiel antioxydant à différents niveaux. Ainsi, le PSS semble être une source prometteuse d'agents antioxydants pouvant exercer un effet protecteur contre le stress oxydant. Ces propriétés lui permettent ainsi d'être utilisé en tant que ingrédient dans l'industrie alimentaire.

Pour cela, on a l'intérêt d'étudier son effet antioxydant dans le salami. Compte tenu de ses propriétés, PSS a montré une diminution significative ($P$ <0,05) de l'oxydation des lipides et de l'oxymyoglobine. En conclusion, ce polysaccharide naturel semble répondre aux propriétés antioxydants et il peut substituer la vitamine C utilisé comme un antioxydant synthétique dans l'industrie alimentaire.

## II. 4. <u>Projet 4.</u> (Responsable Pr. Radhouane KAMMOUN). : *Titre* «Valorisation des Agro-ressources par la voie microbienne»

***Personnel impliqué*:** Pr. Radhouane KAMMOUN; Pr. Hichem CHOUAYEKH; Dr. Mouna KRIAA (Postdoc); Dr. Nadia BAYAR (Postdoc); Marwa BEN RHOUMA-ABBES (doctorante); Yosri BEN NASR (doctorant).

**II.4.1. Extraction, Caractérisation et Fonctionnalité Technologique de trios Polysaccharides de raquette d'*Opuntia Ficus Indica.*** Dans la suite des travaux antérieurs, nous avons étudié deux modifications chimiques des différentes fractions pectiques. La première modification consiste à améliorer la solubilité dans l'eau par différence de pH et de température ce qui a permis d'augmenter, relativement, l'indice de solubilité des différents échantillons. Une deuxième modification a été appliquée par thiolation, une réaction confirmée par spectroscopie infrarouge. Les pouvoirs de rétention d'eau et d'huile, les propriétés moussantes, l'activité de piégeage de DPPH et le test du pouvoir réducteur ont été réalisés pour juger l'efficacité de ces modifications. Comparés aux résultats des échantillons avant modifications, les données obtenues après modifications sont nettement plus intéressants (comparables à ceux de BHT).

**II.4.2. Etude de la valorisation des agro-ressources par fermentation en milieu semi solide afin de produire des bio-fertilisants.** Dans la suite des travaux de ce projet, nous avons optimisé la production de l'acide gibbérellique par la souche B28. La production de l'acide gibbérellique en milieu liquide est maximale à un pH=6 et à une température égale à 30°C. L'amidon et le glucose sont les meilleures sources de carbone. La souche B28 a été identifiée par le biais de techniques

morphologiques et moléculaires comme étant une sous espèce de *Fusarium oxysporum*. L'optimisation des conditions de production de l'acide gibbérellique en milieu semi solide moyennant les Tables de Tagushi L25 a été également réalisée. L'application de cet acide gibbérellique par pulvérisation foliaire sur des plantes de tomate soumises au stress salin améliore les performances des tomates irriguées à l'eau saline en comparaison avec le témoin. L'analyse minérale a montré une augmentation significative de la teneur en $Na^+$ et en $Cl^-$ chez les plantes stressées en association avec une réduction des teneurs en $K^+$ et en $Ca^{2+}$. Pour établir l'homéostasie au niveau du cytoplasme cellulaire, les plantes de tomate tendent à accumuler d'avantage des solutés compatibles. De ce fait, des quantités élevées des teneurs en proline et en sucres solubles ont été enregistrées durant la phase de la croissance végétative chez les plantes subissant un traitement salin.

Egalement, nous nous sommes intéressés à l'isolement et au criblage de souches susceptibles de produire le bio-fertilisant 3-indole acide acétique (l'auxine). Deux souches, K13 et K43, ont été sélectionnées. L'observation microscopique montre que la souche K13 est une levure alors que la souche K43 est de genre *Aspergillus*. L'étude de la cinétique de production en milieu liquide de l'auxine par la souche K13 a montré que le niveau de production est optimal après 240 heures de fermentation et il est de l'ordre de 0.134 g/l. Par la suite, nous avons étudié l'effet de la concentration de tryptophane (100, 200, 300 µg/l) dans le milieu de culture sur la production de l'auxine. Les résultats obtenus montrent que la production est maximale en présence de 200 µg/l. Dans un troisième temps, nous avons étudié l'effet de l'auxine produit par la souche K13 sur les plantes de blé en absence et en présence de différente concentration de NaCl. L'analyse des paramètres de croissance des plantes de blé est en cours.

**II.4.3. Production économique d'un complexe enzymatique par fermentation en milieu solide d'agro- ressources et leurs applications comme additif en nutrition animale.** Un plan Box Bhenken a été appliqué en vue d'optimiser la production de xylanase et β-glucanase via la fermentation semi solide de la souche Y6. D'après le modèle établi, le maximum d'activité est atteint en utilisant le son de blé (3g), une humidité de milieu de 85% et le taille d'inoculum de 4%. La validation de cette condition a permis d'atteindre des activités xylanase et β-glucanase de l'ordre de 569 et 177 U/g respectivement soit 4 et 2 fois plus importantes que celles obtenus en préliminaire. L'optimisation de la production de phytase et mannnase est en cours. Le criblage des facteurs affectant la production de l'Arabinofuranosidase et l'Acide férulique estérase est en cours. L'effet du prétraitement (2h à 90°C puis lavage) des agro-ressources sur la production de différentes activités a été réalisé. Cette étude a montrée que le prétraitement du son de blé à permis de multiplier le rendement de production de xylanase de la souche Y6 par 3 soit 2200 U/g. L'étude du prétraitement des autres ressources et d'autres méthodes de prétraitements telle que l'ultrason sont en cours.

## III. Conclusions et perspectives

*** Aspect appliqué**. Des biomolécules pures et semi-purifiées, des extraits bioactifs et des additifs naturels, des enzymes, des probiotiques, des microorganismes, etc, ont été développés et/ou testés dans les domaines agricole (lutte biologique), agro-alimentaire et nutrition animale. Comme nous l'avons détaillé projet par projet, quelques résultats méritent d'être optimisés pour des applications à grande échelle.

*** Aspect fondamental**. Nous avons initié l'étude moléculaire de quelques gènes codant la mannanase à partir de quelques nouvelles souches de *Bacillus*. Egalement, nous avons démontré que les voies de biosynthèse des trois molécules anticancéreuses de la famille des rhamnopyranosides secrétées par la souche de *Streptomyces* TN58, n'impliquent pas des glycosyl-transférases et les gènes en conséquence sont éparpillés sur le chromosome, chose originale non jamais décrite. De plus, nous avons caractérisé tous les gènes de la voie de biosynthèse d'une de ces trois rhamnopyranosides.

***En Perspectives***.

- Valoriser les acquis de recherche ayant un aspect appliqué et ceci nécessitera l'implication des centres techniques, le tissu industriel et le ministère.
- Pour l'année 2018, nous comptons initier l'étude moléculaire de la voie de biosynthèse d'un métabolite secondaire biologiquement actif de la famille des dicétopipérazines.

# IV. Production scientifique

## IV.1. Publications

**1.** Chakchouk-Mtibaa, A., Smaoui, S., Sellem, I., Najah, S., Karray-Rebai-I., & Mellouli, L. **(2017)**. Biopreservative Efficacy of Bacteriocin BacFL31 in Raw Ground Turkey Meat from the Point of Microbiological, Physico-chemical, and Sensory Qualities. *Biocontrol Science* Vol 22, No2, 67-77.

**2.** I. Sellem, M.A. Triki, L. Elleuch, M. Cheffi, A. Chakchouk, S. Smaoui and L. Mellouli **(2017)**. The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum. Journal of Basic Microbiology*, 57: 393-401.

**3.** Boubakri, L., Chakchouk Mtibaa. A., Hallouma, B., Mansour, L., Mellouli, L., Ozdemir, I., Yasar, S., and Hamdi, N. **(2017)**. A Palladium Catalyst System for the Efficient Cross-Coupling Reaction of Aryl Bromides and Chlorides with Phenylboronic Acid: Synthesis and Biological Activity Evaluation. *Molecules***,** *22(3), 420*. DOI:10.3390/molecules22030420

**4.** Soumaya Najah, Teik Min Chong, Claude Gerbaud, Kok-Gan Chanc, Lotfi Mellouli, Jean Luc Pernodet **(2017)**. Complete Genome Sequence of *Streptomyces* sp. TN58, a Producer of Acyl Alpha-L-Rhamnopyranosides. *Genome Announcements* V. 5 (34), e00828-17.

**5.** Slim Smaoui & Karim Ennouri & Ahlem Chakchouk-Mtibaa & Ines Karray-Rebai & Maher Hmidi1 Kameleddine Bouchaala & Lotfi Mellouli **(2017)**. Relationships Between Textural Modifications, Lipid and Protein Oxidation and Sensory Attributes of Refrigerated Turkey Meat Sausage Treated with Bacteriocin BacTN635. *Food Bioprocess Technology* 10: 1655-1667.

**6.** Dhekra Mhalla, Amira Bouaziz, Karim Ennouri, Rachid Chawech, Slim Smaoui, Raoudha Jarraya, Slim Tounsi , Mohamed Trigui **(2017).** Antimicrobial activity and bioguided fractionation of Rumex tingitanus extracts for meat preservation. *Meat Sciences* 125: 22-29.

**7**. N. Touj , A. Chakchouk-Mtibaa , L. Mansour , A.H. Harrath , J.H. Al-Tamimi , I. €Ozdemir , L. Mellouli , S. Yas¸ ar , N. Hamdi **(2017)**. Copper-catalyzed azideealkyne cycloaddition (CuAAC) under mild condition in water: Synthesis, catalytic application and biological activities. ***Journal of Organomettalic Chemistry*****.** 853: 1-15.

**8.** I. Trabelsi, N. Ktari, S. Ben Slima, K. Hamden and R. Ben Salah **(2017)**. Effect of a probiotic Lactobacillus plantarum TN8 strain on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in rats. *Journal of Animal physiology and animal nutrition* 101. 311-319.

**9.** Naourez Ktari, Imen Trabelsi, Sana Bardaa, Mehdi Triki, Intidhar Bkhairia, Rabab Ben Slama-Ben Salem, Moncef Nasri, and Riadh Ben Salah **(2017)**. Antioxidant and hemolytic activities, and effects in rat cutaneous wound healing of a novel polysaccharide from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *International Journal of Biological and Macromolecules* 95: 625-634.

**10.** Naourez Ktari, Amal Feki, Imen Trabelsi, Mehdi Triki, Hana Maalej, Sirine ben Slima, Moncef Nasri, Ibtissem Ben Amara, and Riadh Ben Salah **(2017)**. Structure, functional and antioxidant properties in Tunisian beef sausage of a novel polysaccharide from *Trigonella foenum-graecum* seeds. *International Journal of Biological and Macromolecules***:** 98: 169-181.

**11.** Imen Trabelsi, Naourez Ktari, Sirine Ben Slima, Kamel Bouchaala, and Riadh Ben Salah **(2017)**. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and, antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. *International Journal of Biological and Macromolecules.* 103:194-201.

**12.** Mehdi Triki, I. Khemakhem, I. Trigui, Riadh Ben Salah, S. Jaballi, Claudia Ruiz-Capillas, Mohamed Ali Ayadi, Hammad Attia and Souhail Besbes **(2017)**. Free-sodium salts mixture and AlgySalt® use as NaCl substitutes in fresh and cooked meat products intended for the hypertensive population, *Meat Science***.** 103: 194-203.

**13.** Naourez Ktari, Intidhar Bkhairia, Rim Nasri, Rihab Ben Abdallah Kolsi, Rabab Ben Slama-Ben Salem, Ibtissem Ben Amara, Najiba Zeghal, Basma Ben Salah, Riadh Ben Salah, Moncef Nasri **(2017).** Zebra blenny protein hydrolysates as a source of bioactive peptides with prevention effect against oxidative dysfunctions and DNA damage in heart tissues of rats fed a cholesterol-rich diet, *Food Research International*. **100, Part 1:** 423-432.

**14**. Sirine Ben Slima, Naourez Ktari, Imen Trabelsi, Mehdi Triki, Molka Feki-Tounsi, Hafedh Moussa, Iskandar Makni, Ana Herrero, Francisco Jimenez-Colmenero, Claudia Ruiz-Capillas Perez and Riadh Ben Salah **(2017)**. Effect of partial replacement of nitrite with a novel probiotic *Lactobacillus plantarum* TN8 on color physic-chemical, texture color, physico-chemical, texture and microbiological properties of beef sausages. *LWT-Food Science and Technology*. 86: 219-226

.

**15.** Hajer Ben Hlima, Rayda Ben Ayed, Karim Ennouri and Slim Smaoui **(2017)**. Geographical Discrimination of Virgin Olive Oils from the Tunisian Coasts by Combining Fatty Acids and Phenolic Acids Profiles within a Multivariate Analysis. *Journal of Olea Science* 66 (9) 963-971.

**16.** Farhat-Khemakhem A, Blibech M, Boukhris I, Makni M, Chouayekh H **(2017)**. Assessment of the potential of the multi-enzyme producer Bacillus amyloliquefaciens US573 as alternative feed additive. *J Sci Food Agric***.** Jul 25. doi: 10.1002/jsfa.8574.

**17.** Nadia Bayar, Tahani Bouallegue, Mabrouka Achour, Mouna Kriaa, Ali Bougatef, Radhouane Kammoun **(2017)**. Ultrasonic extraction of pectin from Opuntia ficus indica cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food Chemistry*. 235: 275-282.

## IV.2. Thèses Soutenues

**1. NAJAH Soumaya**: Thèse de doctorat co-encadrée (Université de Sfax/Université Paris-Saclay) : Encadreur Tunisien, Pr. MELLOULI Lotfi et encadreur Français, Dr. PERNODET Jean Luc). *Etude du métabolisme spécialisé de Streptomyces sp TN58* (Soutenue le 6/12/2017 à l'université de Paris Sud France).

**2. BEN SLIMA Sirine**: Thèse de doctorat de l'ENIS encadrée par Dr. BEN SALAH Riadh.: *Etude des propriétés physico-chimiques, qualités sensorielles, microbiologiques et texturales des produits de charcuterie intégrant des probiotiques et des fibres* (Soutenue le 11 / 12 / 2017).

**3. BAYAR Nadia**: Thèse de doctorat de l'ENIS encadrée par Pr. KAMOUN Radhouane : *Les pectines de raquettes de figuier de barbarie Opuntia ficus indica: choix du procédé d'extraction, optimisation de la production et caractérisation physico-chimique, fonctionnelle et biologique du produit* (Soutenue le 16 / 12 / 2017).

## IV.3. PFE pour l'obtention du diplôme d'ingénieur

**1. BOUBAKHER Insaf**: Projet de fin d'études de l'école de Polytechnique de Sousse encadré par Pr. CHOUAYAKH Hichem: Production, formulation et étude des effets de la supplémentation de *Bacillus*

*amyloliquefaciens* US573 comme additif dans l'aliment du poisson *Dicentrarchus labrex* (Soutenu le 03 /07/2017).
**2. MORJENE Nawrès**: Projet de fin d'études de l'école de Polytechnique de Sousse encadré par Pr. CHOUAYAKH Hichem: Développement de nouvelles applications biotechnologiques basées sur les enzymes phytases et l'acide phytique (Soutenu le 03 /07/2017).

**3. MESTIRI Sarra**: Projet de fin d'études de l'école de Polytechnique de Sousse encadré par Pr. CHOUAYAKH Hichem: Mécanisme responsable de la formation de complexes d'activation de la voie NF-kB et leur ciblage par l'auranofine (Soutenu le 03 /07/2017).

**4. AMARI Sabrine**: Projet de fin d'études de l'ENIS pour l'obtention du diplôme d'ingénieur en génie Biologique encadré par Dr. SMAOUI Slim: Contribution à la valorisation alimentaire de sous-produit de la grenade Tunisienne (Punicagranatum) caractérisation physico-chimique et étude de son potentiel conservateur sur la viande hachée de bœuf (**Soutenu le 21 / 07 / 2017**).

**5. BEN ALI Amna**: Projet de fin d'études de l'école de Polytechnique de Sousse encadré par Pr. MELLOULI Lotfi: identification d'une nouvelle souche de *Streptomyces* TN74 et pré-purification des molécules bioactives (Soutenu le 02 / 10 / 2017).

### IV.4. Brevets

**1.** Nadia Bayar, Mouna Kriaa, Lotfi Mellouli, Radhouane Kammoun **(2017)**. Extractions des pectines par ultrasons à partir de raquettes *d'Opuntia ficus indica* dépourvues de mucilages. **INNORPI TUNISIE TN2017/0335**.

**2.** Ben Slima Sirine, Ktari Naourez, Trabelsi Imen, Triki mehdi, Mellouli Lotfi, Ben Salah Riadh **(2017)**. Substitution du nitrite par la souche probiotique *lactobacillus plantarum* TN8 dans les saucisses fraiches. **INNORPI TUNISIE TN2017/0398**.

**3**. Ktari Naourez, Bkhairia intidhar, Trabelsi Imen, Ben Slima Sirine, Mellouli Lotfi, ben Salah Riadh **(2017)**. Données structurales et effets antioxydant et cicatrisant cutané du polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec (Trigonella foenum-graecum). **INNORPI TUNISIE TN2017/0400**.

**4.** Trabelsi Imen, Ktari Naourez, Ben Slima Sirine, Triki Mehdi, Mellouli Lotfi, Ben Salah Riadh **(2017)**. Données structurales, propriétés antioxydantes et fonctionnelles d'un exipolysaccharide produit par lasouche *lactobacillus* sp.Ca6. **INNORPI TUNISIE TN2017/0512**.

### IV.5. Projets soumis en 2017

- Un projet Tuniso-Portugais
- Un projet PRF
- Un projet TWAS
- Un projet ARIMNET2

## V. Missions et Stages

- Mission Pr. Lotfi MELLOULI du 05 au 08 Décembre 2017 au Laboratoire de Microbiologie Moléculaire des Actinomycètes (MMA) du Département de Microbiologie de l'Institut de Biologie Intégrative de la cellule de l'Université Paris-Sud, Orsay-France.
- Mission Dr. Riadh BEN SALAH, du 23 au 29 Décembre 2017 au Laboratoire de Biochimie et de Biotechnologie de la Faculté des Sciences Wejda-Maroc.
- Fatma KAANICHE (doctorante). Stage de 09 mois Avril-Décembre 2017 à la Faculté de Chimie de Bielefeld- Allemagne.

## 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 |
| Mouna SAHNOUN | Post-Doc | CBS |
| Manel BEN ALI | Post-Doc | CBS |
| Fatama EL GHARBI | Post-Doc | CBS |
| Wassim BEJAR | 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 industriel ainsi que des procédés d'application de ces enzymes et souches. Les enzymes peuvent être obtenues par l'isolement de nouveaux microorganismes producteurs ou par une exploration fonctionnelle de métagénome fécale du dromadaire. Le crible d'enzymes par l'une ou l'autre des stratégies est prolongé par une étude approfondie de leurs propriétés biochimiques, moléculaires et structurales. L'amélioration des performances de ces enzymes, dans le cas de besoin, afin de mieux les adapter aux conditions d'applications industrielles fait partie également de nos stratégies. L'optimisation des conditions de production ainsi que la formulation de certaines de ces

enzymes et leurs tests dans des applications industrielles constituent les objectives finales de nos travaux.

Les enzymes étudiées sont diverses et trouvent leur applications en agroalimentaire en tannerie et dans les détergences. Par ailleurs, nous développons un projet sur la lutte contre le feu bactérien ou on tente d'utiliser les techniques microbiologiques, enzymatiques et moléculaires pour lutter contre l'agent pathogène, *Erwinia amylovora.*

Les travaux du LBMIE sont répartis en trois projets qui font partie du contrat programme du laboratoire 2015-2018. Ainsi, les résultats obtenus au cours de l'année 2017 sont présentés suivant ces trois projets.

## 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 2017concernent, 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- Relations structure-fonctions de la xylanase produite par la souche fongique Aspergillus niger US368*

Outre l'activité glucanase et dans un travail antérieur, la souche *Aspergillus niger* US368 produit une xylanase (XAn11) extracellulaire. Le gène qui code pour cette xylanase a été cloné et exprimé dans *E. coli* BL21. Les résultats ont montré qu'en présence de 3 mM de $Cu^{2+}$ (qui est un puissant inhibiteur pour les activités xylanases), l'activité relative de la xylanse recombinante a été améliorée de 54%. La modélisation moléculaire suggère que la région de contact entre le site catalytique et le peptide His-tag N-terminal apporté par le vecteur PET-28a forme une sorte de poche qui pourrait être responsable de la différence de comportement de l'enzyme native et recombinante envers le cuivre. Cependant, l'expression de cette xylanase était relativement faible et intracellulaire ce qui limite son application industrielle potentielle. Par conséquent, nous avons cherché à surexprimer cette enzyme intéressante en utilisant le système de *Pichia pastoris* pour une utilisation à échelle industrielle. En effet, cette xylanase peut être utilisée avec la laccase (activée par le cuivre) pour hydrolyser les matériaux lignocellulosiques et hémicellulosiques. Afin d'exprimer le gène codant pour la xylanase taguée dans *Pichia pastoris*, le gène a été amplifié en utilisant le plasmide recombinant pET28a(+)-XAn11 et cloné dans le plasmide pGAPZα-B qui permet d'ajouter l'Histidine-tag du coté C-terminale. Le plasmide recombinant ainsi obtenu a été introduit dans la levure *Pichia pastoris*. Les résultats montrent que l'activité xylanase obtenue est inhibée en présence du cuivre. Cela pourrait être due au faite que l'Histidine- tag ajouté du coté COOH interagit avec celle du coté $NH_2$ terminale ce qui empêche la formation du site de fixation du cuivre. Afin de confirmer cette hypothèse, nous allons cloner le gène de la xylanase de *E. coli* tagguée du coté N-terminale dans le vecteur pGAPZα-B mais sans que ça soit tagguée du coté COOH terminale.

D'autre part, nous avons essayé de modifier le pH optimum (pH 5) de la xylanase produite par la souche *Aspergillus niger*. Pour ce faire, un alignement de la séquence protéique de XAn11 a été réalisé avec celle de la xylanase la plus acide ($pH_3$) produite par *Aspergillus kawachi* et avec la quelle

XAn11 possède une identité de 92%. Suite à cet alignement, nous avons choisi de modifier quatre positions qui sont Q66E, S84Y, N170D et N182S. Ces mutations ont été réalisées en utilisant le vecteur pGAPZα-B contenant le gène qui code pour la XAn11-. Le séquençage des gènes des simples mutants obtenus est en cours.

### *b- Optimisation de la production, purification et caractérisation biochimique de l'activité amylase de la souche Bacillus subtilis US572*

Une souche nouvellement isolée nommée US572 a été retenue pour sa production d'activité amylolytique. L'analyse de la séquence nucléotidique de la région intergénique 16S-23S et de l'ADNr16S a montré qu'il s'agit d'une nouvelle souche de *Bacillus subtilis*. Les conditions optimales de culture et de production de l'amylase AmyKS ont été déterminées. Une activité amylolytique de 18 U/ml a été obtenue à 37 °C au bout de 40 h de culture en présence de 1% Amidon comme seule source de carbone. Afin d'améliorer la production de l'amylase en milieu de culture, un plan d'expérience a été établi. En effet, une activité de 56 U/ml a été obtenue en utilisant une matrice de Plackett et Burman (N = 20). L'amylase (AmyKS) a été purifiée en utilisant les techniques chromatographiques classiques. La purification comprend 4 étapes : une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium suivie d'un traitement à la chaleur, une première filtration sur Séphacryl S-200, une chromatographie échangeuse d'anions sur Mono-Q Sepharose suivie d'une deuxième filtration sur Séphacryl S-200. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE) montre que l'enzyme pure se présente sous forme d'une seule bande de 75 kDa. L'Analyse de la masse moléculaire de l'enzyme dans les conditions natives par filtration sur HPLC montre que l'enzyme natif se présente sous forme d'un dimère de masse moléculaire 150 kDa. Une caractérisation biochimique a été réalisée sur l'enzyme pure. L'amylase purifiée a des optima de température et de pH de 60 °C et de 6, respectivement. Les tests de la thermostabilité effectués ont révélé que l'amylase garde 50% de son activité à 55 °C ou à 70 °C après 1 h ou 10 min d'incubation, respectivement. Egalement, l'amylase possède une large stabilité à des pH allant de 4 à 10. L'effet des ions métalliques a été aussi établi sur l'enzyme pure. Les résultats obtenus montrent que l'amylase catalyse la réaction indépendamment de la présence de $Ca^{2+}$. Une diminution de l'activité a été détectée en présence de $ZnSO_4$, $CoSO_4$ et $NiCl_2$, alors qu'en présence de KI et $CuSO_4$ l'enzyme garde la totalité de son activité. L'analyse des produits d'hydrolyse de l'amidon par AmyKS ainsi que l'étude de la spécificité vis à vis des substrats ont montré que l'enzyme est une Alpha amylase. Le gène qui code pour l'amylase AmyKS a été amplifié par PCR en utilisant l'ADNg comme matrice et nous a permis d'obtenir un fragment ayant une taille de l'ordre de 2036 pb. Ce fragment a été cloné et la séquence a été déterminée. L'alignement de la séquence de ce fragment avec la banque de données NCBI a montré de fortes homologies avec des gènes d'amylases du genre *Bacillus*. La traduction de la séquence d'ADN obtenu en séquence protéique montre que le gène est amplifié avec la séquence signale et qu'il code pour une protéine de 658 aa.

## *2- Amylases améliorants de panification*

### *a) Souche S2 d'Aspergillus oryzae*

Nous avons 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, AmyB1 et AmyB2. 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 2017 nous avons mieux caractérisé la forme tétramérique de l'isoforme AmyC produite dans les conditions de production semi solide. Ce travail a abouti à un article en correction. Par ailleurs, nous avons cloné et exprimé le gène codant pour cette amylase dans *Pichia pastoris*. La souche recombinante obtenue produit environ 70 U/ml et montre une seule forme AmyA contrairement à la souche sauvage qui produit plusieurs formes suite à une protéolyse due à des protéases de la souche sauvage. En plus, l'amylase recombinante présente une thermostabilité plus importante ($T_{1/2}$ 45 min à 60 °C) que l'amylase sauvage ($T_{1/2}$ 10 min a 60°C). Ce travail a donné lieu à un article en préparation.

### *b) Amylase de la souche US586 de Bacillus subtilis*

Une souche bactérienne nommée US586 a été isolée et identifiée en tant que *Bacillus subtilis*. 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. Cette souche produit 3 isoformes dite Amy1, 2 et 3. La forme 1 est le produit du gène en question alors que la forme 1 et 2 provient d'une digestion protéolytique. D'autre part, le gène *amy*586 de taille 1.9 kb codant cette activité enzymatique a été amplifié, cloné, séquencé et exprimé chez *E. coli*. En 2017, Nous avons entamé la purification et la caractérisation de l'enzyme recombinante. Comme attendue la souche recombinante montre une seule forme de taille de la forme 1 indiquant qu'il n y'a pas eu de clivage protéique dans *E. coli*. La caractérisation préliminaire de cette amylase recombinante montre qu'elle possède les mêmes propriétés que l'amylase produite par la souche sauvage. 1 article est en cours de préparation relatif à cette partie.

## 3. Etudes et applications des enzymes pour la production de sucres à haut pouvoir sucrant et faible pouvoir calorifique

Parmi les sucres visés par ce travail le D-fructose et le D-Tagatose deux sucres qui se caractérisent par leur pouvoir sucrant élevée et leur pouvoir calorique faible. Dans cette partie de travail nous focalisons sur l'optimisation et l'extrapolation des résultats du procédé de production de sirop de Fructo-Tagatose à partir de lactosérum et le criblage de nouvelles isomérases. Ainsi en 2017 nous avons notamment:

a) Poursuivi l'optimisation des étapes du procédé de production de sirop de Fructo-Tagatose à partir de lactosérum et ce en collaboration avec l'unité de valorisation. Nous avons focalisé surtout sur l'optimisation de production des cellules recombinantes exprimant la glucose isomérase (nommée GISK) de la souche SK de *Streptomyces* sp. et la L-arabinose isomérase de la souche US100. Ainsi la production a été multipliée par 4 environ. Par ailleurs, nous sommes en train d'optimiser l'extrapolation des étapes de purification/désionisation à grande échelle ainsi que l'étape d'immobilisation de la souche recombinante

b) Cloné et exprimé le gène glucose isomérase de la souche thermophile anaérobiques:*Caldicoprobacteralgeriensissp.* TH7C1T. Cette souche, isolée en Algérie est thermophile ($T_{opt}$ de croissance = 65°C) et possède plusieurs enzymes thermostables dont des protéases étudiées en collaboration dans notre laboratoire dans le cadre du projet 2. Pour ces raisons, nous avons

commencé la séquence du génome par le NGS du CBS. La séquence partielle du génome (environ 50%) nous a permis de révéler une glucose isomérase que nous avons amplifié, cloné et exprimé dans *E. coli*. La purification suivi de la caractérisation a révélé une enzyme thermoactive ($T_{op}$ = 90 °C), thermostable et surtout ayant une activité spécifique de 43 U/mg, la plus élevée jamais enregistrée pour des GIs de la même famille. Un brevet d'invention et un article sont en cours de préparation pour cette partie.

## 4. 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 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 criblé une banque métagénomique contenant environ 17000 clones en haut débit en collaboration avec la LISBP (Toulouse, France) utilisant des substrats lignocellulosiques chromogènes. Les résultats obtenus nous ont permis de valider de nombreux clones positifs. Nous avons également sélectionné quelques clones pour le séquençage haut débit par le NGS. Des analyses bioinformatiques des séquences ont permis l'annotation taxonomique et fonctionnelle de ces séquences permettant ainsi d'identifier plusieurs gènes codants pour des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation de la matière lignocellulosique. Nous avons également étudiées en détail les clones 26H3 et 36A23 ce qui a conduit à l'identification de 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. Au cours de 2017, nous avons :

a) Continué la séquence et l'analyse de quelques clones obtenus lors du criblage haut débit de la banque métagénomique construite auparavant. Ainsi nous avons achevé l'étude des clones criblés sur des substrats cellulosiques et les clones 27 L23, 37L23, 13K7, 37L19, 30D20, 24P15 et 37M5 criblés sur le substrat lignine alkali.

b) Exprimé quelques gènes révélés après l'analyse de la séquence de quelques clones. Plus précisément nous avons réussi:

b-1) Le clonage et l'expression d'un nouveau glycoside hydrolases (GH) sous forme His-taguée, appartenant à la famille GH26. La caractérisation préliminaire de l'activité dans l'extrait a montré que l'enzyme exprimé possède plusieurs activités à la fois (β-mannanase, xylanase, cellulase et pectinase). La purification et la caractérisation détaillées sont en cours.

b-2) Le clonage et l'expression de deux peroxydases: Parmi les activités révélées, nous nous sommes intéressés à l'activité peroxydase qui a été détectée sur milieu minimum à base de lignine basique, notamment les clones nommés 24p15 et 37m5, en plus du dosage de cette activité sur milieu liquide. En effet, ces deux clones présentent les meilleures activités peroxydases par rapport aux différents clones testés et qui sont actives aussi sur lignine basique. Les gènes codant l'activité peroxydolytique de ces deux clones d'une taille d'environ 500 pb ont été amplifiés par PCR et cloné dans le vecteur de clonage et d'expression le pET-21(a+). Les peroxydases taguées exprimées dans ce vecteur ont été purifiées en une seule étape par chromatographie d'affinité sur une colonne de Nickel. La peroxydase purifiée nommée TP24p15 présente une masse moléculaire d'environ 14 kDa, estimée sur gel SDS-PAGE, contre 17 kDa pour l'enzyme TP37m5. Il s'agit de deux peroxydases à thiols non hémiques du fait qu'elles sont totalement inhibées par le DTNB et le NEM. Les optima de pH et de

température sont de 10 et 70 °C pour la TP24p15 contre 4,5 et 50 °C pour la TP37m5. La thermostabilité de ces deux peroxydases est améliorée en présence du cuivre à une concentration de 2 et 5 mM pour la TP24p15 et 37M5, respectivement. Ces deux peroxydases sont actives sur une large gamme de substrats phénoliques notamment le 2,4-DCP et le 2,6-DMP. Ainsi, les deux enzymes pourraient être des candidates potentielles pour l'alimentation animale et pour la dégradation des lignocelluloses. La TP24p15 pourrait être aussi un bon candidat pour la détergence.

## Projet 2: « Enzymes d'intérêt industriel pour la détergence et la tannerie » (P2-ECOZYM)

**Responsable du projet : Dr Bassem JAOUADI**
**Chercheurs impliquées :** Dr Jaouadi B, Pr Bejar S, Pr Sayari A, Dr Zaraî Jaouadi N, Dr Frikha F, Dr Kamoun F, Dr Ayadi Zouari D & Dr Rekik H.
**Doctorants mobilisés :** Ben Elhoul Berrouina M, Daoud L, Omrane Benmrad M & Mechri S.

Ce projet comporte plusieurs parties qui s'articulent autour de deux thématiques d'enzymes microbiennes notamment les hydrolases et les oxido-réductases d'intérêt industriel pour la détergence et la tannerie.

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

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.

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

Deux souches nommées VP3 d'*Aeribacillus pallidus* et C250R de *Lysinibacillus fusiformis* issues du Laboratoire de Bioprocédés Environnementaux (LBPE) au CBS, isolées à partir d'un champ pétrolier géothermique, ont été retenues pour leurs activités protéases très intéressantes. L'optimisation de production de l'enzyme issue de la souche C250R a été réalisée avec la méthodologie des plans d'expérience en utilisant un plan de criblage de Plakett & Burman avec 19 expériences et un plan d'optimisation de Box Bhenken. La production optimale de cette protéase à l'échelle Erlenmeyer, est de 3112 U/mL. Deux nouvelles protéases à sérine nommées SPVP et SAPLF ont été purifiées et caractérisés à partir des souches VP3 et C250R, respectivement. L'analyse par SDS-PAGE montre que les enzymes purifiées présentent des masses moléculaires apparentes de 29 et 51 kDa. Le séquençage de leur extrémité $NH_2$-terminale (25 et 27 aa), montre une forte homologie avec les protéases à sérine de *Bacillus*. Les activités spécifiques sont de 58000 et 94333 U/mg à pH 10 et à 60 °C (SPVP) et 70 °C (SAPLF). 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 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. Le gène *spVP* codant la nouvelle protéase SPVP a été cloné, séquencé et exprimé dans *E. coli* BL21(DE3) pLysS. La protéine recombinante (rSPVP), exprimée chez *E. coli* dans l'espace extracellulaire, possède les mêmes caractéristiques que la protéine native.

#### *b) Etude de nouvelles hydrolases issues des souches hydrothermales dans la détergence et la déprotéinisation des déchets de crevettes: cas des protéases SAPAK P1 et P2*

Une souche nommée MV1 d'*Anoxybacillus kamchatkensis* isolée à partir d'une source thermale a été retenue pour son activité protéolytique intéressante (4600 U/mL) sur milieu optimisé. Un zymogramme du surnageant de la souche MV1 montre que la souche secrète 2 protéases P1 et P2. Une purification à homogénéité de ces deux protéases a été réalisée. Les 2 enzymes pures nommées SAPAK P1 et P2 ont respectivement les tailles de 28 et 46 kDa. La caractérisation biochimique de ces deux protéases a été aussi réalisée et l'étude moléculaire est en cours. Nous nous sommes intéressés aussi, à l'optimisation de la déprotéinisation des déchets de crevettes dans le but de leur conversion en une biomasse utile qui est la chitine en utilisant l'extrait enzymatique de la souche M1V. La caractérisation du spectre de la chitine préparée par le traitement enzymatique par FTIR montre qu'elle présente une homologie avec celle de la chitine commerciale. L'optimisation de production de protéases a été effectuée et nous avons trouvé ainsi des activités protéolytiques intéressantes. Un gel SDS a été réalisé et a détecté la présence d'au moins 2 peptides dans le surnageant de taille 15 et 1,42 kDa. Le surnageant de culture est ainsi centrifugé puis lyophilisé afin de purifier les peptides libérés suite à cette hydrolyse et de tester leurs différentes activités biologiques.

#### *c) Propriétés biochimique et moléculaire d'une nouvelle kératinase, ayant un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique très importante pour le traitement des cuirs*

Nous avons déterminé les propriétés biochimiques et moléculaires d'une nouvelle sérine kératinase nommée KERDZ produite par une souche d'actinomycète DZ50 d'*Actinomadura viridilutea* ayant un degré d'hydrolyse et une efficacité catalytique très importante par rapport aux trois kératinases de références (KERAK-29, Actinase E et KERAB). 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. Le gène *kerDZ* a été cloné, séquencé et exprimé dans *E. coli*. Ces propriétés ont montré que la souche DZ50, présente une activité kératinase intéressante et pourra être utilisée avec succès dans l'opération de reverdissage lors de traitement des cuirs.

### 1-2- 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'industrie 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. 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* et MnP TP55 à partir de la souche de basidiomycète i8 de *Trametes pubescens*. Il s'agit de trois protéines monomériques ayant des masses moléculaires apparentes de 30, 45 et 55 kDa et possèdent des valeurs de RZ de 2,1 1,85 et 2,25, 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 ou 2,6-DMP. Les trois enzymes fongiques montrent des valeurs d'efficacité catalytique plus élevées que les peroxydases HaP4, LiP-SN et HRP. La MnP TP55 est 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 2017, ce travail a abouti à la publication de 5 articles et de deux chapitres d'ouvrage scientifique ainsi que 3 brevets d'invention INNORPI. En plus du renouvellement du projet Tuniso-Algérien et la signature d'une convention de recherche avec un industriel.

## Projet 3: « Ciblage enzymatique, microbien et biochimique du pouvoir pathogène d'*Erwiniaamylovora* »

**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 est 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 réussi l'isolement de plusieurs souches *Erwinia amylovora* à partir de plusieurs endroits touchés par le feu bactérien. Ces souches sont en train 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 abouti 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 infectée 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, CONVENTIONS ET COLLABORATIONS

### 1- Publications parues en 2017 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture et à IF

1. **Mechri S, Ben ElhoulBerrouina M, OmraneBenmrad M, Zaraî Jaouadi N, Rekik H, Moujehed E, Chebbi A, Sayadi S, Chamkha M, Bejar S, Jaouadi B. (2017)** Characterization of a novel protease from *Aeribacilluspallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. *Int J BiolMacromol*. ; 94:221-232.
2. **Elgharbi F, Ben Hlima H, Ameri R, Bejar S, Hmida-Sayari A. (2017)** Atrimeric and thermostable lichenase from *B. pumilus* US570 strain: Biochemical and molecular characterization. *Int J BiolMacromol*. ;95:273-280.
3. **Daoud L, Jlidi M, Hmani H, HadjBrahim A, El Arbi M, Ben Ali M. (2017)** Characterization of thermo-solvent stable protease from *Halobacillus* sp. CJ4 isolated from Chott El jerid hypersaline lake in Tunisia. *J. Basic Microbiol*.;57(2):104-113
4. **ZribiZghal R, Elleuch J, Ben Ali M, Darriet F, Rebaï A, Chandre F, Jaoua S, TounsiS.** Towards novel Cry toxins with enhanced toxicity/broader: a new chimeric Cry4Ba/Cry1Ac toxin. *Appl MicrobiolBiotechnol*.;101(14):5949.
5. **Bouacem K, Rekik H, Zaraî Jaouadi N, Zenati B, Kourdali S, El Hattab M, Badis A, Annane R, Bejar S, Hacene H, Bouanane-Darenfed A, Jaouadi B. (2017)** Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9.Int *J. Biol. Macromol*. (17)31229-1.
6. **Mechri S, Kriaa M, Ben ElhoulBerrouina M, OmraneBenmrad M, ZaraîJaouadi N, Rekik H, Bouacem K, Bouanane-Darenfed A, ChebbiA, Sayadi S, Chamkha M, Bejar S, Jaouadi B. (2017)** Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillusfusiformis*C250R. Int. *J. Biol. Macromol*. 101:383-397
7. **Hmani H, Daoud L, Jlidi M, Jalleli K, Ben Ali M, HadjBrahim A, Bargui M, Dammak A, Ben Ali M. (2017)** A *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry: selection based on in vitro functional properties and enzymatic potentialities. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 44(8):1157-1166.
8. **Sahnoun M, Trabelsi S &Bejar S. (2017)** Citrus flavonoids collectively dominate the α-amylase and α-glucosidase inhibitions. *Biologia* 72/7:764-773, Section Cellular and Molecular Biology
9. **Kumar, S., Sukhvinder, Kumar, V., Gupta, G. K., Beniwal, V., Abdmouleh, F., ...& El Arbi, M. (2017).** Antibacterial, tyrosinase, and DNA photocleavage studies of some triazolylnucleosides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, ***36*(8), 543-551.**
10. **Ketata, E., Neifar, A., Mihoubi, W., Pigeon, P., Gouzi, H., Mallet, J. M., ... & El Arbi, M. (2017).** The inhibition of tyrosinase by some aryl butenes: A desired activity or a side effect to avoid. *Journal of OrganometallicChemistry*, ***848*, 133-141**

### 2- Articles/chapitres d'ouvrages scientifiques parus en 2017

1. **Prof Samir BEJAR:** Journal of Biotechnology Research (JBR) volume 17,2017 ISSN: 2356-6221
2. **Nadia Zaraî Jaouadi, Hatem Rekik, Abdelmalek Badis, SaharTrabelsi, Mouna Belhoul, ChirazGorgi Hila, AhlemIrmani, Haifa Khemir, Abdessatar Toumi, Samir Bejar& Bassem Jaouad**. The promising keratin-biodegradationandhide-dehairing activities of

thekeratinase KERUS from*Brevibacillusbrevis*strain US575. ***RecentAdvances in Environmental Science fromthe Euro-MediterraneanandSurroundingRegions*. Springer International Publishing AG, Hardcover ISBN978-3-319-70547-7, November 20, 2017.http://www.springer.com/gp/book/9783319705477#**

3. **Nadia Zaraî Jaouadi, Hatem Rekik, Mouna Ben Elhoul, ChirazGorgi Hila, AhlemIrmani, Haifa Khemir, Abdessatar Toumi, Samir Bejar&Bassem Jaouadi**. The attractiveproprietiesofthekeratinase KERQ7 from*Bacillustequilensis*strain Q7 with promising potential fortheleatherbatingprocess. ***RecentAdvances in Environmental Science fromthe Euro-MediterraneanandSurroundingRegions*. Springer International Publishing AG, Hardcover ISBN978-3-319-70547-7, November 20, 2017.http://www.springer.com/gp/book/9783319705477#**

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

1. **Ameri Rihab, Potocki- Veronese Gabrielle, Hmida-Sayari Aida, Trabelsi Sahar, Bejar Samir:** Un cluster de gènes 36A23C, codant pour des enzymes originales pouvant être utilisées comme additifs pour l'alimentation animale et pour la dégradation des lignocelluloses, à partir d'une banque métagénomique de microbiote fécal du dromadaire. **Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE TN2017-0053 du 22/02/2017**
2. **Mouna Sahnoun, Saibi Walid, Trabelsi Sahar, Bejar Samir** : L'effet hypoglycémiant de l'extrait de l'Agave americana et de l'acide p-coumarique y compris celui extrait de cette plante via leur fort effet inhibiteur de l'alpha amylase humaine. **Brevet d'Invention INNORPI TUNISIETN2017-0056 du 22/02/2017**
3. **Mechri Sondes, Kriaa Mouna, Ben Elhoul Berrouina Mouna, Omrane Benmrad Maroua, Zaraî Jaouadi Nadia, Rekik Hatem, Moujehed Emna, Chebbi Alif, Sayadi Sami, Chamkha Mohamed, Bejar Samir, Jaouadi Bassem** : 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 TUNISIETN2017-0057 du 22/02/2017**
4. **Omrane Benmrad Maroua, Mouhehed Emna, Baffoun Ayda, Zouari Riadh, Bejar Samir, Jaouadi Bassem** Production, purification et carctérisation physico-chimique et moléculaire d'une nouvelle sérine protéase nommée SAPTEX de la souche X5 de *Penicillumchrysogenium* destinée au traitement des taches protéiques sur support textiles
5. **Omrane Benmrad Maroua, MECHRI Sondes, Zaraî Jaouadi Nadia , Ben ElhoulBerrouinaMouna, Rekik Hatem, Sayadi Sami, Bejar Samir, Jaouadi Bassem** Production , purification et caractérisation biochimique d'une nouvelle sérine protéase nommée SPPS acido-résistante et thermostable produite par une souche de CTM10057 de *Pleurotus sajorcaju* tolérante en présence des solvants organiques et active et stable dans les détergents de lavage

## 4- Liste des thèses soutenues en 2017

**Hatem REKIK:** "Criblage, étude, amélioration et application de peroxydases et de protéases pour la détergence" Diplôme de thèse de doctorat en Génie Biologique soutenue le 11 Novembre 2017**.**
**Encadreurs : Pr Samir BEJAR et Dr BassemJAOUADI**
**2. Mouna BELHOUL:** Production, purification et caractérisation biochimique et moléculaire des peptidases d'Actinomycètes d'intérêts industriel. Diplôme de thèse de doctorat Sciences Biologiques soutenue le 16 Décembre 2017**.**
**Encadreur : Dr Bassem JAOUADI**

**3. Lobna DAOUD MALLEK:** Microorganismes halophites sources de nouvelles enzymes industrielles: approches biochimiques, moléculaires, structurales et génomiques.
**Encadreur: Dr Mamdouh Ben Ali**

## 5-Liste des mastères soutenus en 2017

**1- Ihsen OMRI** et **Melle Rihab BOKRI**, étudiantes en Mastère Professional enTechnologie Alimentaire (Régime LMD) à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax(ISBS) de l'Université de Sfax. Titre du sujet : « **Extraction et caractérisation de l'enzyme coagulant le lait issu de la souche TBS09 de *Pseudomonas fluorescens***
». Date de soutenance : le 10/07/2017 à l'ISBS. Encadreur: **Dr Nadia ZARAI JAOUADI**.
**2- Ikbal MAJDOUB**, étudiante en Mastère Professional en Technologie Alimentaire (Régime LMD) à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax (ISBS) de l'Université de Sfax.
Titre du sujet : « Production, purification et caractérisation biochimique d'une protéase la souche CTM10057 de *Pleurotus sajorcaju* pour la coagulation du lait »
». Date de soutenance : le 10/07/2017 à l'ISBS.
**Encadreur : Dr Bassem JAOUADI** et
**Co-encadreur**: **Dr Walid SAIBI**.

## Ouverture du LR/UR sur son environnement

### 6-Organisation des manifestations scientifiques

**1.** Organisation du 15ème **Journées Internationales de Biotechnologie (IDB2018/JIB 2017)** de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) ont eu lieu du 18 au 22décembre 2017 à Hammamet- Tunisie, .**Pr-. Samir BEJAR: Coordinateur ; Pr-.Adel SAYARI et Dr Bassem JAOUADI: comité scientifique et d'organisation**
**2.** Participation à l'organisation de la 8 ème conférence Internationale Arabe de l'Association des Biotechnologies arabes: biodiversité, biosécurité et bioindustrie du 01-02Novembre 2017 à Charm el-Cheikh- Egypte. **Pr Samir BEJAR: Comité Scientifique**
**3.** Participation à l'organisation du «1st Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI) » qui a lieu du 22 au 25 Novembre 2017 à l'hôtel Mövenpick, Sousse. **Dr Bassem JAOUADI: Membre du Comité Scientifique International**

### 7- Conventions/contrats signés en 2017 avec des partenaires socio-économiques nationaux

**1**. Convention entre le LBMIE/CBS et la Société EJM sur l'introduction des protéases , amylases et peroxydases dans les détergents liquides de la société EJM: Convention signée le 5 décembre 2017 et envoyé pour le Ministère après avoir tenu compte des remarques du service juridique

### 8-Conventions signées en 2017 dans le cadre des projets de coopération scientifique bilatérale.

**Programme de Recherche Tuniso-français PHC-UTIQUE code: 17G1215**
Développement de nouvelles molécules antibactériennes : Repositionnement, pharmaco-modulation, synthèse et études biologiques.
**Responsable: Dr Mehdi ELARBI**

Montant du financement pour l'année 2017 en DT: **8000 DT**

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

## مخبرأساليب الغربلة الجزيئية والخلوية

**Responsable : Pr. Ahmed REBAI**

**Email : ahmed.rebai@cbs.rnrt.tn**

## LISTE DES MEMBRES DU LABORATOIRE

**Chercheurs** :
*Professeurs* : Mohamed Sami Aifa, Saber Masmoudi, Hammadi Ayadi, Hassen Hadj Kacem
*Maitre-Asistants*: Najla Kharrat, Sami Mnif, Mariem Ben Said, Mohamed Ali Mosrati, Dorra Idris, Adel Tekari, Imen Ayedi, Salima Belguith-Maalej, Imen Benrebeh, Leila Ayedi, Boutheina Cherif, Lobna Bouchaala, Soumaya Triki.
**Cadres techniques et administratif**:
*Ingénieurs* : Bochra Mellouli, Riadh Ben Marzoug
*Techniciennes* : Salma Zouari, Fida Jbeli
*Secrétaire* : Monia Mlaouh
**Post-doctorants**: Rayda Ben Ayed, Aissette Baanannou, Jihéne Elloumi, Rihab Kallel, Faten Rmida.
**Etudiants en thèse** : Sabrine Bel Mabrouk, Fatma Trigui, Hela Gargouri, Emna Ayedi, Rania Ammar, Faten Abdelli, Marwa Jardak, Amal Bouzid, 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* : Prévenir les maladies cardiovasculaires (MC) demeure une priorité de santé publique dans le monde et en Tunisie. De plus, les MC constituent une des maladies chroniques

liées au vieillissement provoquant des changements biochimiques et physiologiques graduels, ainsi que des altérations de la réponse immune et de la capacité antioxydante. Par ailleurs, plusieurs micronutriments sont indispensables au bon fonctionnement de certaines enzymes antioxydantes, à l'efficacité du système immun, à l'équilibre métabolique et au contrôle du statut inflammatoire.

Ce travail vise l'exploration du statut antioxydant et l'évaluation de dix cytokines chez des patients à régime méditerranéen et à haut risque ou atteints d'une maladie coronarienne suivant trois échelles de gravité. Spécifiquement, il consiste à génotyper des polymorphismes fonctionnels des gènes codants pour des métalloprotéines impliquées dans l'activité antioxydante et à l'étude du microbiome oral et son impact sur l'évolution de la maladie.

Une fiche de renseignement a permis de collecter de données démographiques, le niveau socioculturel ainsi que les habitudes alimentaires d'une série de patients. Toutes les précautions visant la confidentialité des informations ont été rigoureusement respectées. Le formulaire de consentement a été signé avant l'inclusion des sujets dans l'étude.

Nous avons colligé un échantillon de cent 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+).

Nous avons alors évalué les facteurs antioxydants incriminés dans cette pathologie à savoir les protéines GPx et SOD et étudier leur corrélation avec les habitudes alimentaires, les données cliniques et biologiques et l'évolution de la maladie.L'analyse par régression logistique a inclus les quatre facteurs significatifs identifiés par l'analyse univariée, à savoir le sexe, l'activité physique régulière, le rapport tour de taille /tour de hanche et la situation professionnelle. Parmi celles-ci ce sont le sexe, la situation professionnelle et l'activité physique régulière qui restent significatives alors que le rapport tour de taille / tour de hanche perd sa significativité. En outre aucune corrélation n'a été trouvée entre l'activité de SOD et GPx et les autres paramètres biologiques. Sur la base de ces résultats, nous avons étendu nos résultats à d'autres pathologies cardiaques telle que l'insuffisance cardiaque ; de ce fait, une cinquantaine de patients regroupant les critères requis ont été recrutés et seront évalués pour les mêmes paramètres.

*Cancer du sein* : Il s'agit d'étudier l'expression protéique de six bio-marqueurs pour un échantillon de 170 tumeurs de cancer du sein inflammatoire. L'analyse des données a montré la valeur pronostique de trois biomarqueurs, à savoir le Bcl2, Ki67 et P53.

*Les endocrinopathies* : Les endocrinopathies sont 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.

Exploration du transcriptome de thyréocytes de patients atteints de MAIT : 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. Pour plus de spécificité, les résultats acquis par les travaux de biopuces sur un échantillon réduit des ARN totaux extrait seront confirmés par des explorations à la fois quantitatives et qualitatives des transcriptomes par la nouvelle génération de séquençage et l'approche RNAseq. 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.

Génétique moléculaire des endocrinopathies monogénique : 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. 23 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, 12 exomes (5 partiels et 7 totaux) ont été lancés. Des analyses sont en cours, 4 familles atteintes de l'insuffisance hypophysaire sont déjà classées (gène PROP1 et KISS1R) et 4 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

Durant les premières phases du projet nous avons réussi à mettre en place un modèle fiable et reproductible pour étudier les activités anti-biofilms. Ce modèle (*Staphylococcus epidermidis S61*) est actuellement utilisé pour le criblage de molécules ou extraits présentant des activités anti-biofilms (anti-adhérence et éradication).

*Les micro-organismes endophytes sources de molécules à activités anti-biofilms :* Durant l'année 2017, nous avons procédé à l'élargissement de la collection des microorganismes endophytes par l'isolement de nouvelles bactéries à partir d'autres plantes dans diverses régions de la Tunisie. L'identification moléculaire et l'étude phylogénétique des nouvelles bactéries isolées ont montré l'affiliation de la majorité de ces souches au genre Bacillus. L'analyse des extraits de ces bactéries par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-HESI HRMS Q-Exactive) est réalisée en collaboration avec le laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes de l'Observatoire Océanologique de Banyuls-sur-Mer, Sorbonne Universités, France. Les résultats ont montré la présence de molécules communes entre extraits des bactéries de genre *Bacillus* et d'autres spécifiques pour chaque souche. Les molécules présentes dans les extraits retenus ont été purifiées et l'activité anti-biofilm de ces molécules pures a été évaluée.

*Synergies entre huiles essentielles pour amélioration des activités d'anti-adhérences et d'éradication des biofilms microbiens* : L'étude des activités anti-biofilms de quelques huiles essentielles tenant compte de leur composition chimique a permis de les classer selon leurs potentialités anti-biofilms. Par la suite, une classification des huiles étudiées basée sur leurs compositions en monoterpènes et sesquiterpènes a été effectuée moyennant le calcul de la distance euclidienne et l'analyse en composante principale (ACP), en vue de dégager les corrélations et expliquer la différence des activités enregistrées par rapport à la composition et l'abondance moléculaire. Par la suite, les synergies entre les différentes huiles ont été étudiées et différentes combinaisons ont été proposées tenant compte des résultats préliminaires enregistrés. Les manipulations ont été lancées aussi sur un autre modèle bactérien et les mécanismes d'action de ces inhibiteurs de formation des biofilms sont en cours d'étude. La figure ci-dessous illustre l'effet enregistré pour l'huile essentielle de C. v. sur le biofilm de *Staphylococcus epidermidis S61* (Fig 1.).

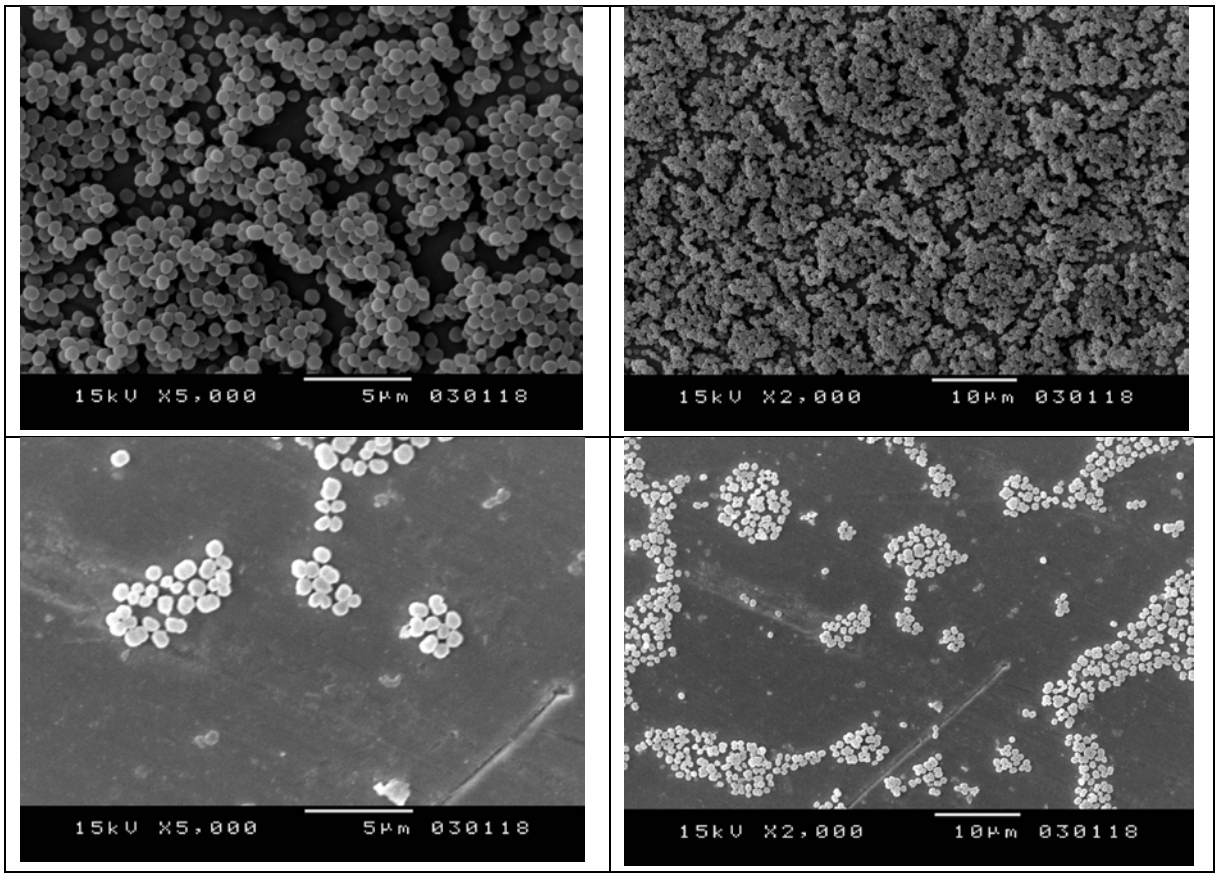



**Figure 1 :** Photos obtenues par microscopie électronique à balayage montrant l'effet de l'huile essentielle de C.v.sur la formation de biofilm de Staphylococcus epidermidis S61 (effet anti-adhérence).

*Approche biotechnologique pour le nettoyage des biofilms contaminants les industries agroalimentaires :* Les biofilms contaminants les industries agroalimentaires constituent une menace potentielle pour la santé humaine et un souci pour les industriels. En effet, ces biofilms sont responsables de la détérioration de la qualité organoleptique du produit et des toxi-infections alimentaires. Les méthodes conventionnelles de nettoyage ne sont plus efficaces et d'autres stratégies de lutte contre ces biofilms sont en train d'être développées. Dans ce cadre, nous avons lancé une nouvelle stratégie de lutte contre les biofilms microbiens qui repose sur la conception/développement de nouvelles formulations à base de produits biotechnologiques et qui pourraient être efficaces dans l'élimination de ces biofilms. Ces molécules agissent sur les composants de la matrice polymérique extracellulaire et sur les cellules formant le biofilm (molécules bactéricides, enzymes, etc…). Les tests

ont été effectués jusqu'à maintenant sur un modèle de biofilm mono-espèce et les résultats sont encourageants et promoteurs. Nous continuons à travailler sur des modèles plus complexes. Cette partie du travail, une fois achevée, fera l'objet d'un brevet d'invention.

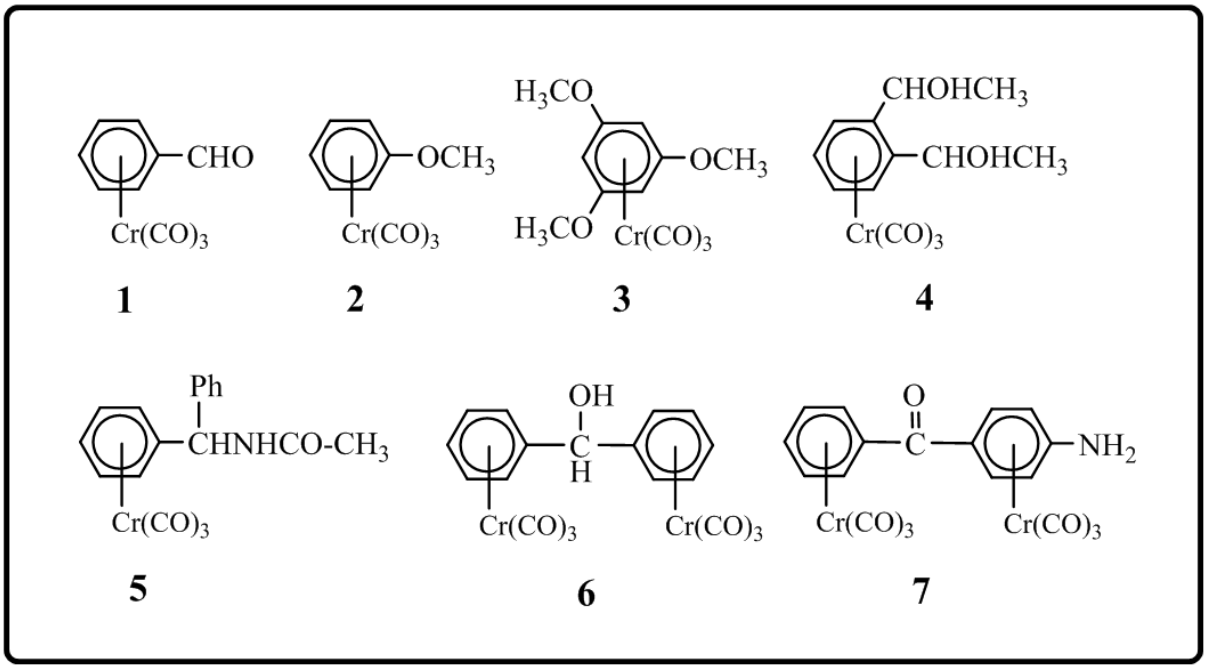
## Projet 3 : Ciblage des voies de signalisation mammifère.

Notre activité s'est focalisée sur la recherche de nouveaux antagonistes à la signalisation des cellules cancéreuses à travers le criblage de librairies disponibles de molécules de synthèse ou naturelle. Nous testons les molécules en premier lieu pour leur effet cytotoxique spécifique aux lignées tumorales.

*Criblage des molécules de synthèse pour leur activité anti-tumorale*

Nous avons continué le travail sur les produits chromés obtenus dans le cadre de la collaboration avec l'Ecole de Chimie de Paris. Il s'agit de composés organométalliques à base d'Arène tricarbonylchromium produits par complexation des arènes au chrome. Sept composés ont été utilisés ; leurs structures chimiques sont données c-i-dessous :

Cytoxicité vis à vis des lignées tumorales : Les produits organiques chromés et le chrome inorganique $K_2Cr_2O_7$ ont été évalués *in vitro* pour leur activité anti-tumorale par le biais du MTT. 4 lignées tumorales ont été choisies et représentantes des différents tissus malins: adenocarcinome du sein (MCF-7), adenocarcinome epithélial colorectal (Caco-2) et carcinome cervical (HeLa et son contaminant Hep2)**.** Les cellules embryonnaires 293 du rein humain ont été utilisées comme cellules non tumorales. Toutes les lignées cellulaires, Caco-2, HeLa, Hep2, MCF-7 et HEK293, ont été traitées par des concentrations croissantes de chaque composé testé. Le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé à chaque concentration tout en utilisant des cellules contrôles non traitées.




Les résultats obtenus ont montré clairement une inhibition de croissance cellulaire dose- dépendante qui augmente avec l'augmentation de la concentration du composé utilisé. Les valeurs d'IC50 sont représentées dans le tableau ci-dessous et la figure 2:

| Composé | Hela | Caco-2 | Hep-2 | MCF-7 | Hek 293 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14.89 ±0.6 | 128.51±0.9 | 56.61±2 | 30.42±0.6 | 325.92 ±25 |
| 2 | 55.33±9 | 21.32 ±0.3 | 17.36± 0.9 | 9.72 ±1 | 101.04±13 |
| 3 | 14.87± 1 | 18.34±2 | 5.79 ±0.2 | 15.31±2 | 25.21±2 |
| 4 | 3.60±0.5 | 203.11±12 | 8.62±0,6 | 58.68±4 | 7.87±0,9 |
| 5 | 118.29 ±9 | > 100 | 190 ±9 | 491.8 ±20 | 32.24±5 |
| 6 | 125.70 ±10 | > 100 | 262 ±13 | 196.59± 33 | 96.32±12 |
| 7 | 59.24±6 | > 100 | 10.10±0.9 | 61.56 ±2 | 21.19±0.7 |
| $K_2Cr_2O_7$ | 2.60±0.4 | 2.40± 0.2 | 1.88±0.3 | 20.93±0.6 | 1.41±0.2 |

Changements morphologiques

Les cellules des différentes lignées cellulaires ont eu des changements morphologiques suite au traitement avec chaque composé chromé. Ces changements ont été suivis sous microscope et ont montré un aspect arrondi et pycnotique des cellules pour Hep2, HeLa, Caco-2 et MCF-7 traitées par la concentration IC50 de chaque composé et plusieurs cellules ont été détachées de la surface des flasques tandis que les cellules non- traitées restent adhérentes et en croissance.

Analyse de l'apoptose par fragmentation de l'ADN

Les cellules ont été traitées par les concentrations IC50 et létale de chaque composé pendant 24h avant l'extraction de l'ADN et analyse par éléctrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats ont montré que tous les composes ont provoqué une fragmentation de l'ADN, ce qui confirme un effet apoptotique.

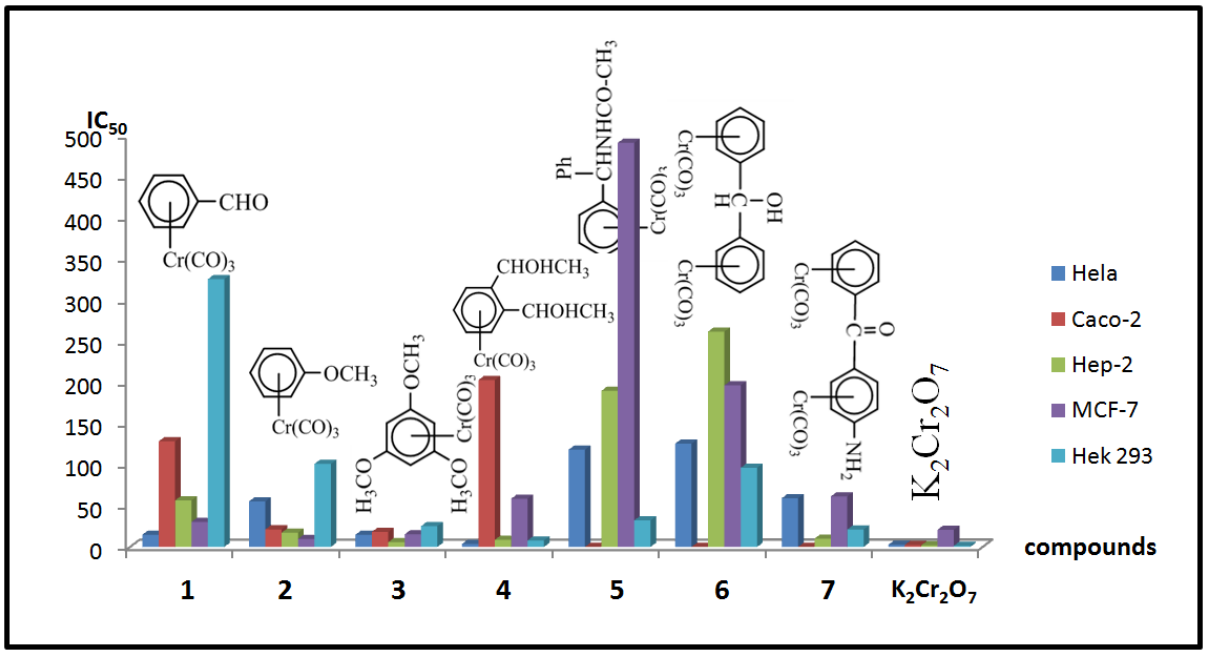



**Figure 2**: Valeurs de l'IC50 des composés sur les lignées tumorales et témoin (Hek293).

*Criblage des huiles essentielles pour leur activité anti-tumorale*

Cytotoxicité : L'huile essentielle du romarin (ROEO) a été évaluée pour ses activités anti-tumorales *in vitro* contre des cellules cancéreuses humaines en utilisant un dosage MTT. Les deux lignées cellulaires, Hela et MCF-7, ont été exposées à des concentrations croissantes de ROEO. La figure suivante montre le pourcentage de survie cellulaire par rapport à des concentrations croissantes de l'huile essentielle en comparaison avec le contrôle, qui représente les cellules non traitées. Nous avons trouvé que le pourcentage de viabilité cellulaire diminue avec l'augmentation des concentrations en

huiles essentielles. Les valeurs IC50 ont été calculées. ROEO a présenté un effet cytotoxique variable sur les lignées cellulaires Hela et MCF-7 avec une activité plus prononcée contre les cellules Hela. ROEO a fortement inhibé la prolifération des cellules Hela avec une valeur IC50 de 0,011 µl ml-1, tandis qu'à une concentration de 0,253 µl ml-1, il inhibait 50% de la prolifération cellulaire MCF-7.
Analyse de la migration cellulaire : Afin d'étudier la migration cellulaire et la prolifération des cellules non traitées et traitées avec ROEO, le test de migration cellulaire a été réalisé. Les résultats ont montré que la plaie disparaissait rapidement au bout de 48 h pour les cellules non traitées par rapport à la plaie dans les cellules traitées dont les cellules sont recouvertes lentement pendant le même temps d'incubation pour les cellules Hela et MCF-7.

## 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. Les 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 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 lignées cellulaires humaines a été suivie d'une étape de co-transfection par la construction exprimant la pendrine et trois siRNAs : deux siRNAs (1,2) clonés dans le vecteur p-silencer et un siRNA 3 sous forme simple appelé nue. Après 48h de transfection, les ARNs ainsi que les protéines totaux ont été extraits et l'effet des siRNAs sur l'expression du gène a été comparé par apport au niveau d'expression obtenu par les cellules transfectées uniquement par la construction sauvage du gène SLC26A4. Afin de déterminer le pouvoir d'extinction exact de chaque siRNA on a eu recours à la PCR en temps réel. La quantité et la qualité des acides nucléiques extrait (total RNA) ou synthétisés (cDNA) ont été expertisés selon les standards internationaux publiés dans le MIQE guidlines (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments). La comparaison du niveau d'expression du gène SLC26A4 a été effectuée par le calcul du ΔΔCt et du pouvoir d'extinction de chaque siRNA en utilisant le gène GAPDH comme calibreur de référence et le niveau d'expression du gène chez les cellules transfectées uniquement par la construction sauvage du gène SLC26A4 comme un niveau avec 0% d'atténuation. Les résultats obtenus montrent une diminution du niveau d'expression du gène SLC26A4 traitée par les trois siRNAs. Ceci est prouvé par le calcul du % du knockdown qui est de l'ordre de 80 % pour siRNA1 et siRNA2 alors que le troisième siRNA3 a montré une efficacité légèrement supérieure de l'ordre de 93%. La diminution du niveau d'expression en présence des siRNA témoigne qu'ils sont spécifiques et très efficaces pour notre gène d'intérêt. Ils ont des pourcentages de réduction des messagers très importants allant de 80 à 90% pour une concentration initiale égale à 50µM pour chaque siRNA, avec 105 cellules ensemencées.
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). Ces travaux nous ont amené à évaluer l'effet des doses de transfection sur le pouvoir atténuateur de chaque siRNA et essayer de trouver la concentration la plus faible avant de tester leur pouvoir lorsqu'ils sont nus (appliqués directement ; dissocié d'un vecteur). Les résultats obtenus seront par la suite confirmés sur un modèle de cellules épithéliales de poumons (A549) et des cellules de patients asthmatiques. Les effets des siRNA sur le transcriptome seront évalués par RNASeq moyennant la nouvelle génération de séquençage (NGS). Cette approche à haut débit d'analyse permettra l'identification des gènes et des voies affectés par l'atténuation du gène SLC26A4 particulièrement les voies impliquant les gènes CFTR, MUC5A et les transporteurs d'ions.

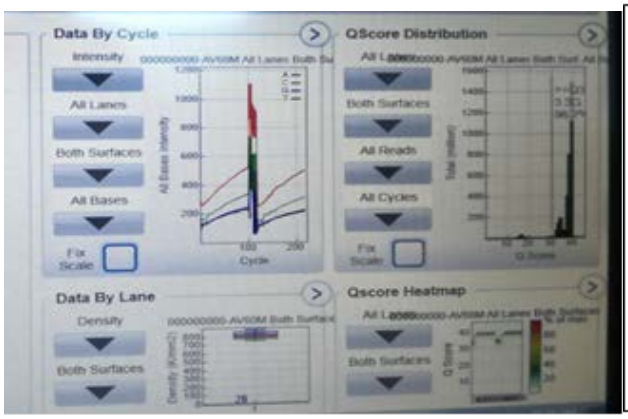
*Criblage et couplage des nanoparticules pour une meilleur vectorisation, traçabilité et stabilité des oligonucléotides* : Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor. L'utilisation des nanoparticules dans le cadre plus spécifique de la médecine connaît 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) : 'LaVO4:Eu 5%' et 'CeVO4: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 TbVO4, 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 Y2Ti2O7 et Y2Ti2O7: 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). Dans l'incapacité de synthétiser des nanoparticules fonctionnalisables et façonnable par notre collaborateur local à la Faculté des Sciences de Sfax, nous avons choisis de se procurer de nanoparticules dont la toxicité réduite a été déjà confirmée sur des modèles animaux visant la thérapie des pathologies pulmonaires fréquentes. L'acquisition de ces nanoparticules est en cours de négociation avec des collaborateurs étrangers.

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

Au cours de l'année 2017, nous avons effectué le séquençage d'exome entier d'individus sourds chez lesquels aucune mutation dans les gènes connus n'a été trouvée par la puce tunisienne NADfchip ou le kit de séquençage MiamiOtoSeq. En particulier, le séquençage de trois cas, effectué dans le cadre de collaborations internationales, a permis d'identifier trois nouveaux gènes: (1) chez le premier cas la neuropathie auditive est associée à une atrophie optique. Le séquençage de l'exome a révélé des mutations dans le gène FDXR. Ce gène code pour la ferredoxin réductase mitochondriale, impliquée dans la biosynthèse des agrégats fer-soufre (ISC s) et la formation de l'hème. (2) le deuxième nouveau gène est CDC14A. Il code pour une phosphatase. Dans l'oreille interne de souris, la

protéine CDC14A a éte localisée dans les kinocils des cellules ciliées, les corps basaux et les stéréocils. Nous avons montré que les souris mutantes homozygotes développent une dégénérescence des cellules ciliées. De même, les poissons zèbres mutants, obtenus en utilisant CRISPR-Cas9, développent également une surdité. (3) Finalement, le troisième gène code pour une protéine mitochondriale SSBP1. La mutation est localisée dans la région 3'UTR et elle serait responsable de l'hyperexpression du gène. Nous avons essayé cette année d'établir une lignée modèle du poisson zèbre par CRISPR-Cas9. Parmi neufs gRNA testés, six n'ont pas montré de coupure, alors que les résultats d'injection de trois autres ainsi que la co-injection de deux gRNA demeurent à confirmer. Vu les difficultés rencontrées pour reproduire la mutation de la région 3'UTR chez le poisson, nous allons essayer en parallèle un autre modèle, la levure. Nous avons cloné le gène orthologue chez la levure sous ses formes sauvage et muté dans un vecteur d'expression. La prochaine étape sera d'exprimer ces vecteurs dans la levure et voir les conséquences sur la prolifération, la morphologie et la respiration des cellules.

Comme prévu dans le contrat programme, la troisième année a été aussi consacrée à la validation du kit développé pour enrichissement et séquençage haut débit. Les 84 gènes choisis couvrent une région de l'ordre de 368kb et sont responsables de sept maladies sensorielles et trois maladies neurologiques. L'enrichissement est réalisé en solution. Nous avons optimisé cette étape pour qu'elle soit réalisée seulement en 2 jours en partant d'une quantité d'ADN initiale égale à 50ng. Le séquençage en parallèle de différents échantillons d'ADN a montré la haute qualité des résultats obtenus. Moyennant le logiciel SureCall, les séquences obtenues sont assemblées puis alignées avec des séquences de références des régions des gènes ciblés. L'analyse bioinformatique a révélé la présence de mutations chez 8 individus. Toutes ces mutations ont étés validées par le séquençage Sanger.




Interface du logiciel 'Sequence Analysis Viewer'. Le «Data by Lane Plot» montre une densité moyenne optimale de clusters de l'ordre de 843K/mm2. Le 'QScore Heatmap' confirme la bonne qualité de nos séquences durant tous les cycles avec des Qscores entre Q30 et Q40 . Le «Data by Cycle Plot» montre que le séquençage effectué dans les deux sens assurant plus de profondeur. La qualité des quatre bases est homogène.

Concernant la recherche de biomarqueurs de la presbyacousie, nous nous sommes intéressés aux différences de méthylation dans des régions intragéniques et nous avons identifié une différence de méthylation significative d'un ilot CpG localisé dans le gène CDH23. Ce gène code pour une composante des liaisons stéréociliaires de l'oreille interne. La validation par Methylation-Specific PCR a montré également une hyper-méthylation avec une augmentation significative de 4.117 ± 0.7565 fois dans le groupe de malades par rapport aux témoins. Les niveaux de méthylation d'ADNs de l'îlot CpG de ce gène étaient significativement (p-value = 0,0364) associés à la presbyacousie avec un risque accru de l'ordre de 2,219. De plus, nous avons élargi notre étude comparative de transcriptomes d'individus atteints de la presbyacousie par rapport aux témoins. Pour se faire, nous avons développé un pipeline d'analyse de données transcriptomiques sous programmation R et Perl en utilisant différents packages du projet Bioconductor: commençant par le traitement de données brutes, contrôle qualité et normalisation des données, filtration des valeurs extrêmes aberrantes puis la sélection et

l'annotation fonctionnelle de gènes intéressants pour le mécanisme auditif. Ainsi, 353 gènes ont été identifiés significatifs FDR<0,05 avec une différence d'expression de log|FC|>2, correspondant à 322 gènes sous-exprimés et à 31 gènes sur-exprimés chez les malades par rapport aux témoins. Parmi les gènes sous-exprimés, nous avons sélectionné les gènes OTOS et SLC26A11 comme biomarqueurs intéressants en se basant sur les annotations fonctionnelles. La différence d'expression a été validée entre les groupes de presbyacousie et contrôle par la PCR quantitative. Par ailleurs, nous avons montré, en utilisant les techniques d'hybridation in situ et de la PCR quantitative chez le poisson zèbre, que ces gènes présentent une expression dans l'oreille interne à partir de quatre jours après fertilisation et continuent de s'exprimer jusqu'au stade adulte. Ainsi, le poisson zèbre constituera un modèle intéressant pour l'étude fonctionnelle de ces gènes et le criblage de molécules thérapeutiques.

**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 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. Une deuxième exploration par NGS du génome mitochondrial animal est planifiée pour cette année dans l'objectif de confirmer les résultats déjà générés par la première manipulation et de fournir plus de variants de discrimination d'espèce ayant des poids variables. 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, ces travaux ont été acceptés pour publication *dans International Journal of Food Properties* (Dec 2017).

*Identification individuelle* : L'année 2017 a été consacrée à la comparaison des mtSNPs, analysés par séquençage haut débit, dans différentes scènes de crimes. Cette comparaison a dévoilé une difficulté dans la distinction des variations de l'hétéroplasmie et des mélanges d'ADN. Ainsi, nous avons envisagé le séquençage en masse d'un nombre plus important de SNPs nucléaires. Ce séquençage massif ouvrira de nouvelles applications de la biométrie de l'ADN. Dans ce cadre, nous participons à un projet national fédéré, récemment accepté, pour la mise en place d'une banque de données biométriques multimodales de lutte contre le terrorisme. Une corrélation de données biométriques de l'ADN avec celles de l'imagerie de l'iris et faciale sera établie. A l'état actuel, nous avons collecté les données biométriques d'une centaine individus.

## Tableau récapitulatif des activités

| Articles | Thèses en cours | Brevets | Participations congrès | Mastères soutenus | Thèses soutenues | Conférences organisées |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 17 | 16 | 2 | 5 | 5 | 2 | 2 |

## Liste de Publications parues en 2017


1. Kallel R, Belguith S, Zouari E, Mnif M, Abid M, Hadj Kacem H. Intronic variants of SLC26A4 gene enhance splicing efficiency in hybrid minigene assay. *Gene*. 2017. 620:10-14.
2. Tekari A, May RD, Frauchiger DA, Chan SC, Benneker LM, Gantenbein B. The BMP2 variant L51P restores the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in the presence of intervertebral disc cells. *Eur Cell Mater*. 2017. 33:197-210.
3. Frauchiger DA, Tekari A, Wöltje M, Fortunato G, Benneker LM, Gantenbein B. A review of the application of reinforced hydrogels and silk as biomaterials for intervertebral disc repair. *Eur Cell Mater*. 2017. 34:271-290.
4. Hajer Ben Saad, Nadia Kharrat, Dorra Driss, et al. Effects of vanillin on potassium bromate-induced neurotoxicity in adult mice: impact on behavior, oxidative stress, genes expression, inflammation and fatty acid composition. 2017. *Archives of Physiology and Biochemistry*.
5. Belmabrouk S, Kharrat N, Abdelhedi R, Ben Ayed A, Benmarzoug R, Rebai A.Screening of nucleotide variations in genomic sequences encoding charged protein regions in the human genome. *BMC Genomics*. 2017 18:588.
6. Jardak M, Abdelli F, Laadhar R, Lami R, Stien D, Aifa S, Mnif S. Evaluation of biofilm-forming ability of bacterial strains isolated from the roof of an old house. *J Gen Appl Microbiol*. 2017. 63: 186-194.

7. Jardak M, Elloumi-Mseddi J, Aifa S, Mnif S. Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of Rosmarinusofficinalis L. essential oil from Tunisia. *Lipids Health Dis.* 2017 16:190.
8. Paul A, Drecourt A, Petit F, Deguine DD, Vasnier C, Oufadem M, Masson C, Bonnet C, Masmoudi S et al. FDXR Mutations Cause Sensorial Neuropathies and Expand the Spectrum of Mitochondrial Fe-S-Synthesis Diseases. *Am J Hum Genet.* 2017, 101 :630-637.
9. Feki-Tounsi M, Khlifi R, Louati I, Fourati M, Mhiri MN, Hamza-Chaffai A, RebaiA. Polymorphisms in XRCC1, ERCC2, and ERCC3 DNA repair genes, CYP1A1 xenobioticmetabolism gene, and tobacco are associated with bladder cancer susceptibility inTunisian population. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017 28: 22476-22484.
10. Bouhajja H, Kacem FH, Abdelhedi R, Ncir M, Dimitrov JD, Marrakchi R, JamoussiK, Rebai A, El Feki A, Abid M, Ayadi H, Kaveri SV, Mnif-Feki M, Bougacha-Elleuch N. Potential Predictive Role of Lipid Peroxidation Markers for Type 2 Diabetes in the Tunisian Population. *Can J Diabetes.* 2017: 17: S1499-2671.
11. Ayed RB, Ennouri K, Hlima HB, Smaoui S, Hanana M, Mzid R, Ercişli S, Rebai A. Identification and characterization of single nucleotide polymorphism markers in FADS2 gene associated with olive oil fatty acids composition. *Lipids Health Dis.* 2017 16:138.
12. Jabeur H, Drira M, Rebai A, Bouaziz M. Putative Markers of Adulteration ofHigher-Grade Olive Oil with Less Expensive Pomace Olive Oil Identified by Gas Chromatography Combined with Chemometrics. *J Agric Food Chem*. 2017, 65:5375-5383.
13. Choura M, Rebaï A. Exploring disorder in the human charged biased proteins. *J Recept Signal Transduct Res.* 2017, 37:386-390.
14. Ben Ayed R, Ennouri K, Ben Amar F, Moreau F, Triki MA, Rebai A. Bayesian andPhylogenic Approaches for Studying Relationships among Table Olive Cultivars. *Biochem Genet.* 2017,55:300-313.
15. Feki-Sahnoun W, Hamza A, Njah H, Barraj N, Mahfoudi M, Rebai A, Hassen MB. A Bayesian network approach to determine environmental factors controlling Kareniaselliformis occurrences and blooms in the Gulf of Gabès, Tunisia. *Harmful Algae*. 2017, 63:119-132.
16. Khlifi R, Olmedo P, Gil F, Hammami B, Hamza-Chaffai A, Rebai A.Gene-environment interactions between ERCC2, ERCC3, XRCC1 and cadmium exposure in nasal polyposis disease. *J Appl Genet*. 2017, 58:221-229.
17. Zghal RZ, Elleuch J, Ben Ali M, Darriet F, Rebaï A, Chandre F, Jaoua S, TounsiS. Towards novel Cry toxins with enhanced toxicity/broader: a new chimeric Cry4Ba/Cry1Ac toxin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017,101:113-122.

## Thèses de doctorat soutenues en 2017

1. Faten Rmida: ‘Marqueurs haplotypiques: Polymorphisme et Multiplexage pour l’identification de l’empreinte Génétique et l’Etude de Filiation. ’ soutenue le 20 Mai 2017.
2. Karim Jellali: Diaryl-Butène analogues du Tamoxifène : Effets Biologiques, Physiologiques et Applications .Soutenance le 22 Juin 2017.

## Mastères de recherche soutenus en 2017

1. Mastére en Génomique et Protéomique Marwa Ghariani intitulé : Evaluation de l’extinction du gène SLC26A4 par des siRNA moyennant la technique de la PCR quantitative.’ Soutenue le 11 décembre 2017.
2. Mastère professionnel en Biotechnologie médicale de Ines Elloumi intitulé : ‘Développement d’un kit séquençage haut débit pour l’aide au diagnostic moléculaire de multiples maladies héréditaires dans la population Nord-Africaine’. Soutenue le 18 Juillet 2017.

3. Mastère en Biotechnologie microbienne de Asma Yaich intitulé : ‘New Strategy to eradicate biofilm contamination in the dairy industry through biotechnological approaches’. Soutenue le 19 Décembre 2017.
4. Mastère en Génomique-Protéomique Nadia Ayadi intitulé : Etude de la Diversité Génètique de l’olivier cultivé en Tunisie par les Marqueurs SNP’. Soutenue le 29 Décembre 2017.
5. Mastère en Génomique/protéomique Rihab Boujelbene intitulé : ‘Nanobiotechnology, an innovative way for the diagnosis of Alzheimer’s disease’. Soutenue 29 Décembre 2017.

## Organisations des manifestations scientifiques en 2017

- Conférence ESBM2017 (http://esbm2017.atcu.tn )
- Atelier Zebrafish du 17 au 20 avril 2017 dans le cadre du projet Tuniso-Allemand TUNGER

## Financement en 2017:

Sur contrat-programme : 112,500 DT

1. 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 : 37.000 DT
2. 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)’ Budget: 25.000 DT .
3. Projet dans le cadre de la coopération Tuniso-Indienne. Budget : 20.000 DT
4. Projet (PRF) :’PBMLT : Plateforme Biométrique Multimodale de Prévention contre le Terrorisme’, Budget : 50.000 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

| Nom et prénom | Qualité(3) |
|---|---|
| Ilem HASSAIRI | Ingénieur Général chef de l'US |
| Adel ZITOUN | Ingénieur en Chef |
| Najoua AYEDI | Ingénieur Principal |
| Imen REKIK | Technicien Principal de labo |
| Nizar ELLEUCH | Technicien de labo |
| Kamel M'RAD | Technicien de labo |
| Faiçal BOUKHILI | Technicien |
| Leila ELLEUZ | Ingénieur Principal |
| Salah BOUAZIZI | Technicien |
| Mohamed AMRI | Ouvrier |

## Objectif global

L'objectif global de l''Unité spécialisée (US) 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.

L'Unité spécialisée (US) a pour objectifs de développer, 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.

## Objectifs spécifiques

- Contribuer au développement des activités de recherches des différents laboratoires du CBS;
- Prendre en charge des expériences de scale-up, de production, de formulation 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;
- Assister les chercheurs dans la maîtrise et l'utilisation des différentes technologie et la production des divers bioproduits,
- Produire à grande échelle (pilote) des cellules ou des biomolécules par fermentation pour une éventuelle application industrielle
-
- Résoudre les contraintes technologiques rencontrées par les industriels dans leurs activités;

.

**Activités de l'unité UVRR**

Les principales activités de l'Unité Spécialisée (US) sont :

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

- ***2ème activité*** : Assistance et extrapolation à l'échelle pilote des projets de recherche élaborés par les diff**éren**ts laboratoires du CBS.
- ***3ème activité* :** Prestation de services pour les différents laboratoires de recherche du CBS et le monde académiques et socioéconomique

**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 enzymatique pour l'extraction des huiles de pépins de figue de barbarie et mise au point d'un procédé d'extraction et de valorisation des fleurs, écorces et raquettes de figue de barbarie.

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 (La Société NOPAL) fait partie au dit projet et va être 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.* ***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 pour la 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 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.

Certains coproduits de l'industrie NOPAL (écorces, farine de raquettes et fleurs) 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 les farines de raquettes et les fleurs de figue de barbarie vers la production de polyphénols et ceci pour une éventuelle future application agroalimentaire et/ou pharmaceutique.

Pour ce faire, trois solvants ont été testés à savoir : l'eau, l'éthanol et le mélange Eau/Ethanol. 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 7.04 mg EAG/g (Ethanol) et 23,91 mg EAG/g (Eau), et 29.99 mg EAG/g (Ethanol/Eau) d'autre part, la concentration des flavonoïdes varie entre 2,2 mg ER/g (Ethanol) et 2,43mg ER/g (Eau) et 3.19 mg EAG/g (Ethanol/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. Cependant, le meilleur taux d'extraction des polyphénols à partir des raquettes est obtenu lors de l'utilisation de l'eau. le taux d'extraction des polyphénols à partir des fleurs de figue de barbarie varie entre 10.26 mg EAG/g (Ethanol) et 22.48 mg EAG/g (Eau), et 26.92 mg EAG/g (Ethanol/Eau) d'une part, d'autre part, la concentration des flavonoïdes varie entre 12.39 mg ER/g (Ethanol) et 11.66 mg ER/g (Eau) et 20.75 mg EAG/g (Ethanol/Eau) ce selon la nature du

solvant (Tableau 2). Le taux d'extraction des polyphénols à partir des raquettes de figue de barbarie varie entre 6.09 mg EAG/g (Ethanol) et 25.92 mg EAG/g (Eau), et 21.26 mg EAG/g (Ethanol/Eau) d'une part, d'autre part, la concentration des flavonoïdes varie entre 4.01 mg ER/g (Ethanol) et 1.75 mg ER/g (Eau) et 4.22 mg EAG/g (Ethanol/Eau) ce selon la nature du solvant

Le rapport (polyphénols /flavonoïde) établi pour les fleurs varie entre 1,92 (Eau) et 0.8 (Ethanol) et 1.29 (Eau/Ethanol). Par ailleurs, Cependant, le rapport (polyphénols /flavonoïde) établi pour les raquettes varie entre 1.51 (Eau) et 14.81 (Ethanol) et 5.03 (Eau/Ethanol).

L'analyse des résultats obtenus à partir des plans d'expériences (surface de réponse de box behenken) réalisés pour l'optimisation de l'effet de trois variables à savoir l'extrait sec ($X_1$), le temps ($X_2$) et la température d'incubation ($X_3$) et ceci pour les trois variétés végétales a montré que les effets de la variation de l'extrait sec de la matière végétale ainsi que le temps d'extraction sont très significatifs sur le taux d'extraction des polyphénols. Alors que, l'effet de la variation de la température 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 concentration de l'extrait sec et du temps présentent des variations très significatives pour les taux d'extraction des poly phénols ce qui montre le type second degré du modèle établi.

Les modèles établis concernant les taux d'extraction des polyphénols à partir des trois matières végétales utilisées (fleurs (Y1), raquettes (Y2), écorce (Y3))s'exprimes de la façon suivante :

$Y1 = 7.776-3.637\ X_1 + 1.166\ X_2 +1.562\ X_1^2 + 1.449X_2^2$ pour les fleurs

$Y2 = 8.92-5.216\ X_1 + 1.912\ X_2 +1.445\ X_1^2 + 1.489X_2^2 -2.276\ X_{12}$ pour les raquettes

$Y3= 10.944-4.32\ X_1 + 1.691\ X_1^2 -2.474X_{12}$ pour l'écorce

Les concentrations optimales calculées par les différents modèles établis et validés relatifs à l'extraction des polyphénols à partir des fleurs, raquettes et écorces de figue de barbarie sont un extrait sec de l'ordre de 59 g/l, 16.7 g/l,70 g/l respectivement, une température supérieur à 32°C, 28°C, 30.5°C et un temps d'incubation de 10h, 6h, 10h respectivement.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques produits par la réactivité avec les radicaux libres DPPH et ABTS ont montré que le pourcentage d'inhibition varie d'une matière à une autre (tableau 1 et 2)

**Tableau 1 : Evaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques par la**

**réactivité avec les radicaux libres DPPH et ABTS**

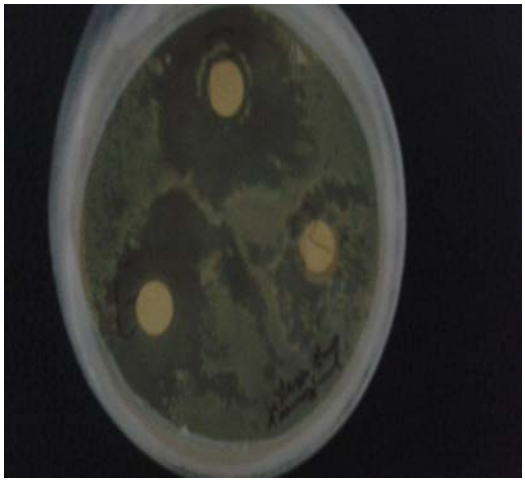
| | % d'inhibition | EQ TRO mg/ml | EQ tro mg/g ES | EQ tro mg/g MS |
|---|---|---|---|---|
| Ecorce | 54,9371609 | 0.16 | 16.6 | 5,15 |
| Fleur | 94,5784448 | 0.28 | 28.5 | 4 |
| Raquette | 35,4834932 | 0.10 | 10.8 | - |

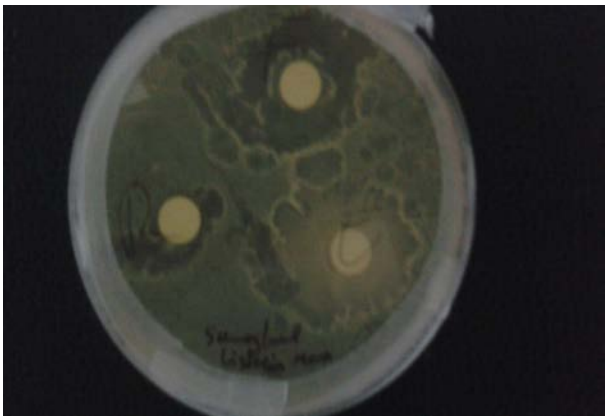
**Tableau 2 : Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH**

| | **IC 50** |
|---|---|
| Ecorce | 7.9 mg/ml |
| Fleur | 1 mg/ml |
| Raquette | 12.3 mg/ml |

Des tests antimicrobiens ont été réalisés pour évaluer les activités antimicrobiennes en effet après lyophilisation des extraits en polyphénols provenant de la raquette, la fleur et l'écorce de la figue de barbarie dans le solvant composé de 50% en eau distillée et 50% en éthanol absolue, ils ont été dissous uniquement dans de l'eau distillée à différentes concentrations 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml et 25 mg/ml et ont été mis en contact avec 4 souches différentes (*Staphylocoque, pseudomonas, listeria monocytogenes, Escherichia Coli)* pour tester leurs éventuelles activités antimicrobiennes

Il est à signaler que les trois extraits ont présenté des activités antimicrobiennes différentes vis-à-vis des souches testées. Les meilleurs halos d'inhibition ont été obtenus chez les fleurs (figue 1). Les trois extraits testés ont présenté des activités antimicrobiennes face aux souches de Staphylocoque, de pseudomonas et de listeria monocytogene., Les résultats obtenus de l'étude de l'effet de la concentration des extraits ont montré que la meilleure concentration d'inhibition de la croissance de la souche *listeria monocytogènes* par exemple était de l'ordre de 100 mg/ml (figure 1)





1 a. Extraits à 100 mg/ml 1 b. Extraits à 50 mg/ml,

**Figure 1:** Evaluation des activités antimicrobiennes des extraits de fleur, d'écorce et de raquette de figue de barbarie ; souche de *listéria* à $10^3$ ufc /ml

### *I .2. Développement d'un procédé d'extraction des huiles à partir des pépins de figue de barbarie basé sur la technologie enzymatique*

Un procédé d'extraction basé essentiellement sur les enzymes est mis au point pour extraire la fraction lipidique de pépins et du tourteau 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. 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. L'extraction enzymatique a été conduite par utilisation de plusieurs enzymes sur deux lots secs de graines du figuier de barbarie (Opuntia ficus indica) d'origine tunisienne et de tourteau caractérisées par une teneur en matière grasses variable. L'analyse des résultats obtenus a montre que le pourcentage d'extraction des huiles varie entre 4,7 et 5,9 %, pour les graines et de 0.6 à 0.8% pour les touteaux selon le type d'enzyme utilisée.

En effet, l´enzyme 1 [XCBS] donne la meilleure valeur d'extraction (90 %). L'enzyme 2 [XL] l'enzyme 3 [CCBS] et l'enzyme 4 [PL] 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 0.36 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 six enzymes testées. 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 % et ceci pour la majorité des enzymes testées.

La composition des extraits huileux des graines de figue de barbarie obtenus par extraction enzymatique est déterminée par la méthode de silylation. En effet, une quantité BSTFA/pyridine agent de silylation a été ajoutée a chaque extrait d'huile qui est ensuite incubé à 80°C pendant 45minutes (temps nécessaire pour la réaction de silylation). Les composées obtenues sont représentés dans le tableau 3 et figure 1.

**Tableau 3 :** Composition de la fraction volatile des graines en fonction de la nature de l'enzyme

| Composés | TR (min) | Super press | Enzyme1 | Enzyme 2 | Enzyme 3 | Enzyme 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Acide Myristique** | 8,06 | 0,2% | - | 14,23% | 0,15% | 2,33% |
| **Acide Palmitoloique** | 11,7 | 3,61% | 2,05 % | - | - | - |
| **Acide Palmitique** | 11,9 | 17,38% | 22,47 % | 18,08% | 25 % | 30,34% |

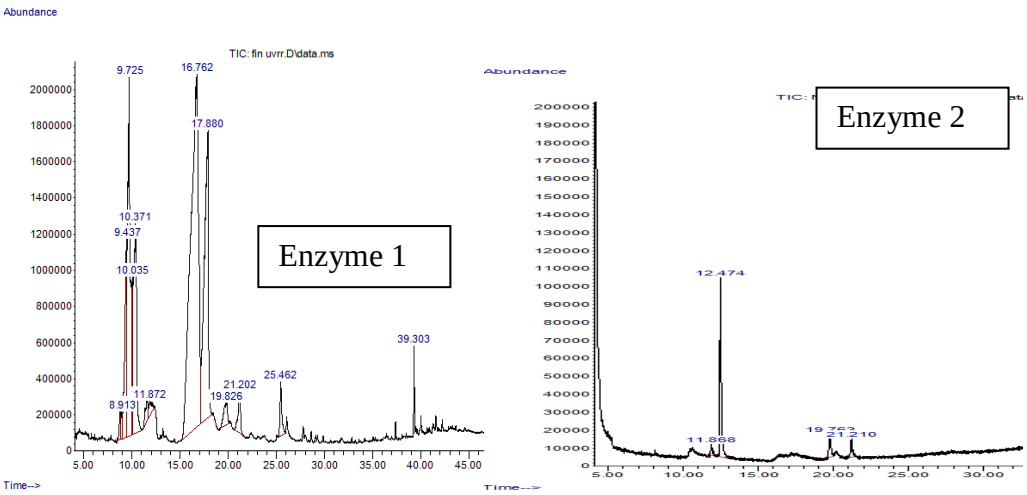
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Acide Linoléique** | 19,28 | 5,8% | 4,79% | - | 45,6% | - |
| **Acide Oléique** | 19,60 | 2,9% | 49,23% | 45,04% | 12,08% | 37,18% |
| **Acide Stéarique** | 21,06 | 0 | 6,11% | 17,85% | 10,82% | 19,87% |
| **Acide Arachidique** | 24,19 | 0,25% | - | - | 0,5% | 0,94% |

Les résultats montrent que les acides gras identifiés dans les quatre extraits aux différents enzymes sont les même identifiés chez l'extrait par super press. Les six constituants dans l'extrait au Enzyme 3 ont été identifiés: l'acide linooléique en majorité (45,6%), l'acide palmitique (25%), l'acide oléique (12%), l'acide stéarique (10,82%), l'acide myristique (0.15%) et l'acide arachidique (0,5%).

Cinq constituants dans l'extrait au Enzyme 1 ont été identifiés : l'acide oléique en majorité (49,23%), l'acide palmitique (22,47%), l'acide stéarique (6,11%), l'acide linoléique (4,79%) et l'acide palmitoléique (2,05%).

De même, il est à noter que les deux autres extraits au Enzyme 2 et Enzyme 4 (deux enzymes commerciales) renferment cinq constituants en fraction volatile avec un taux assez important en acide oléique, c'est un acide gras doublement insaturé très recherché en produit cosmetique, il est de l'ordre de 45,04% pour l'enzyme 2 et de 37,18% pour l'enzyme 4. L'acide palmitique existe avec un taux de 30,34% dans l'extrait à l'enzyme 4 et un taux de 18,08% dans l'extrait à l'enzyme 2 (figure 2).

En conclusion les quatre extraits sont caractérisés par une richesse en acide gras et que l'acide oléique présente le majeur constituant dans la majorité des extraits.



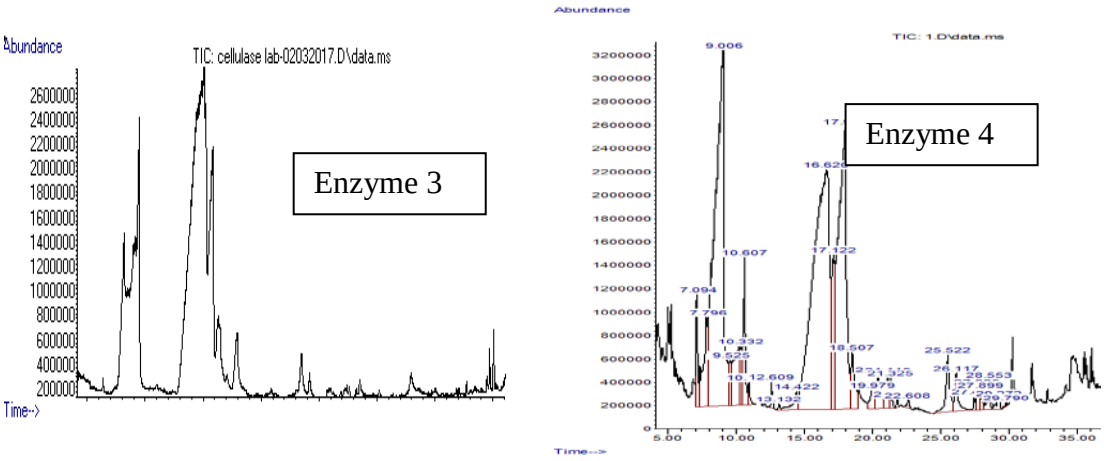



**Figure 2:** Composition biochimique des huiles de pépins de figue de barbarie

La composition de la fraction volatile du tourteau de figue de barbarie est déterminée par la méthode de méthilation. L'analyse des extraits enzymatiques d'huiles a été réalisée par CPG et nous a permis d'identifier différents composés d'acide gras dont la composition est illustrée dans le tableau 3 et figure 3.

Les résultats montrent que les acides gras identifiés dans les différents extraits enzymatiques sont les même. Quatre constituants sont identifiés dans l'extrait des tourteaux à l'enzyme 3. Cependant, trois constituants ont été identifiés dans l'extrait à l'enzyme 1 et 2 (tableau 4et figure 3). Il est à signaler que a meilleure concentration en Acide linoléique a été obtenue par extraction des tourteaux à l'enzyme3 (18.9%).

**Tableau 4 : Composition de la fraction volatile du tourteau**

| Acide Gras | TR | Enzyme 1 | Enzyme 2 | Enzyme 3 Area % |
|---|---|---|---|---|
| **Acide palmitique** | 9,32 | 48,39 | 43,92 | 30 |
| **Acide linoléique** | 13,8 | 15,11 | 13,51 | 18,91 |
| **A. Cis vaccénique** | 13,9 | - | - | 24 |
| **Acide stéarique** | 15,01 | 36,50 | 32,82 | 25,84 |

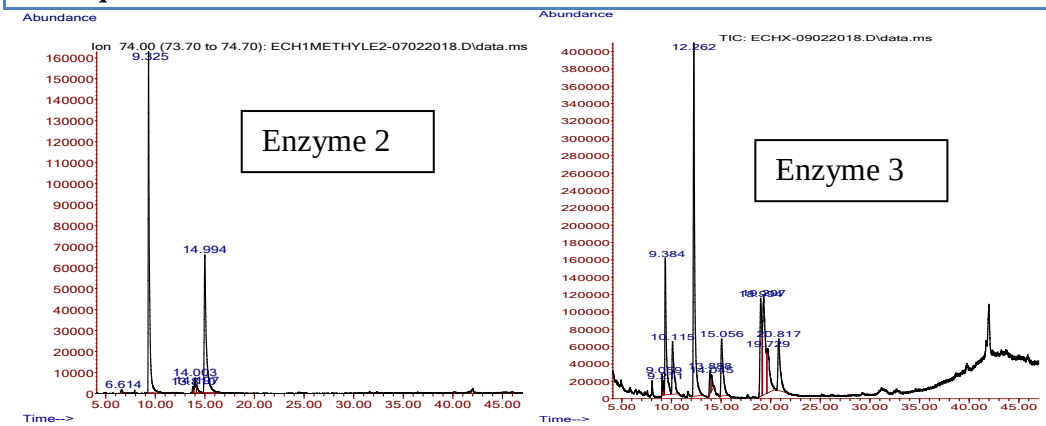



**Figure 3 : Composition biochimique des huiles du tourteau de figue de barbarie.**

***2ème activité*** : Assistance et extrapolation à l'échelle pilote des projets de recherche élaborés par les différents laboratoires du CBS.

Cette activité consiste à extrapoler à l'échelle pilote un procédé de fabrication de sirop de Fructo-Tagatose à partir de lactosérum et la production des grandes quantité des enzymes (protéases et lipases)

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

A l'US, 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 du laboratoire LBMIE pour son développement.

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'une part, 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, d'autre part de purifier le lactose du lactosérum..

La mise en place d'un procédé de production de sirop de Fructo-Tagatose par les cellules recombinantes *d'Echerchia coli* à partir du lactosérum a nécessité une optimisation des étapes de prétraitement du lactosérum. Ainsi, un traitement physique basé sur les techniques membranaires est utilisé. La séparation du lactosérum a été réalisée par microfiltration tangentielle et par rotavap respectivement. Les conditions opératoires de la microfiltration tangentielle (pression transmembranaire, température, vitesse de circulation) sont optimisées. L'extrapolation de la production des cellules recombinantes par fermentation dans un fermenteur de capacité 20 litres en batch- alimenté a été réalisé et la faisabilité technologique de ce projet est étudiée.

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. 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%.

## II.2. Production des enzymes (protéases et lipases)

Dans le cadre du projet PNRI KER-LIP 2017-2018 qui rassemble le CBS, CNCC, la société SO. Et. Cuir et l'ENIS portant sur le Développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de traitement des peaux ovines : reverdissage, épilage-pelanage et dégraissage enzymatiques, plusieurs études d'optimisation des conditions de cultures, fermentations et concentrations des extraits enzymatiques sont réalisées. Des grandes quantités d'enzymes produites, dans un milieu économique à base du lactose du lactosérum sont formulées à l'échelle pilote au sein de l'UVRR et sont transférées à la société SO.Et.Cuir fédérée au projet pour une éventuelle application industrielle. L'Extrapolation des conditions optimales de production des enzymes à partir de deux souches recombinantes de bacillus, sélectionnées ultérieurement au LBMIE, de l'échelle laboratoire à une grande échelle (en fermenteurs de capacités croissantes) a été réalisée en batch et Les bilans matières et gazeux sont dégagées et la faisabilité technologique a été confirmée et validée.

***3ème activité* :** Prestation de services pour les différents laboratoires de recherche du CBS et le monde socioéconomique et académiques

### II1.1. Prestation de services pour les différentes laboratoires de recherche du CBS

L'Unité de Valorisation des Résultats de la recherche assure également une assistance aux laboratoires du CBS dans la l'accomplissement des cultures de micro-organismes par fermentation, des expériences de formulation par les opérations unitaires de séparation, de concentration, de séchage et d'essais.

Les principaux travaux de prestation de services réalisés, ,pour le compte des laboratoires du CBS sont les suivants :

**1.** Réalisation de 6 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 21 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.** Accomplissement de 3 fermentations pour la production de biomolécules à activité antifongique ou antibactérienne dans un fermenteur de capacité totale 5 L et 20 L. Cette production a été réalisée pour le compte du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB) du CBS (tableau 5).

**4.** Réalisation de 10 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 5)

**5.** Réalisation de 2 fermentations pour la production des enzymes ( -glu) dans des fermenteurs de capacité croissantes 20 L et 100 Litres. Ces fermentations ont été réalisées pour le compte de l'unité du Laboratoire des bioprocédés environnementaux (LBPE)du CBS (tableau 5)

**6.** Réalisation de 1fermentation pour la production des Biomolécules actives dans des fermenteurs de capacité 20 L. Cette fermentation a été réalisée pour le compte du Laboratoire LPCMC du CBS (tableau 5)

**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 6).

**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 6).

**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,) de la cellulose, du maïs, des pépins et des écorces. Cette opération a été réalisée pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse et de laboratoire de biopesticide du CBS et autres.

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

**12.** Analyses physico-chimiques offertes aux différents laboratoires et unités du CBS à savoir : dosage d'azote (organique et minérale) par la méthode de Kjeldahl (minéralisation, distillation, dosage), mesure spectral UV-visible. Ces analyses ont été réalisées pour le compte du Laboratoire de valorisation de la biomasse, du laboratoire des procédés environnementaux, du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules du CBS et du Laboratoire de Microorganismes Microbienne et d'Ingénierie des enzymes et autres (tableau 6).

**Tableau 5 : Nombre total de fermentation, volumes totaux préparés et la durée total d'incubation réalisées au l'an 2017 pour le compte des laboratoires du CBS**

| Laboratoires | Nombre de fermentation | Volume total | Durée totale d'incubation |
|---|---|---|---|
| l pest | 21 | 527 | 70 |
| LBME | 6 | 67 | 47 |
| LBMIE | 10 | 276 | 30 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| LBPE | 2 | 65 | 21 |
| LMB | 3 | 30 | 12 |
| LMBPE | 2 | 24 | 7 |
| LPCMC | 1 | 12 | 2 |
| **Total général** | **45** | **1001** | **189** |

L'unité spécialisée (UVRR) a réussi de mettre en place des programmes spécifiques de scale up mul Des coopérations avec les organismes nationaux et autres et des conventions avec le monde économique ayant pour objectifs la prestation de services, l'application des résultats de la recherche et la valorisation.

**Tableau 6 : Prestations de services : séparation, concentration, séchage et autres, réalisées au 2017 pour le compte des laboratoires du CBS**

| Laboratoires | Séparation/concentration | Broyage/ séchage | Analyses |
|---|---|---|---|
| LBMIE | 13 | 04 | 08 |
| LBPE | 07 | 07 | 08 |
| LMB | 00 | 14 | 23 |
| LB.pest | 25 | 08 | 03 |
| LBME | 00 | 05 | 02 |
| LPCMC | 00 | 02 | 05 |

- Il est à noter que L'unité spécialisée (UVRR) à participé au montage de projet PRF (APPEL A PROPOSITIONS 2017-2019) qui rassemble le Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules, le Laboratoire des Biopesticides et l'Unité Spécialisée'UVRR) du Centre de Biotechnologie de Sfax, le Laboratoire des Ressources génétiques de l'olivier de l'Institut d'Olivier de Sfax, le Laboratoire de Recherche Toxicologie de la Faculté des Sciences de Sfax portant sur le développement des biopesticides et de biofertilisants pour une agriculture durable respectueuse de l'environnement.

### III.2. Prestation de services pour les différentes autres structures de recherche et le monde socio-économique

L'unité spécialisée assure également une assistance aux autres établissements et aux mondes socio-économiques dans la réalisation d'analyses et des opérations unitaires dont l'unité dispose. Citons par exemple :

- Séchage par lyophilisation ;
- Analyse physicochimique MES, analyse de phosphore

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 2 lyophilisations des solutions enzymatiques et des produits végétales pour le compte de l'unité enzyme et bioconversion ENIS.

- Analyses physico-chimiques et microbiologique à savoir la détermination des matières en suspension et le dosage et de phosphore dans des produits alimentaires et ce. pour le compte de la société AGROMED

L'UVRR a élaborer une coopération dans le cadre d'une convention payente avec les sociétés « GIPA » et « AGROMED » portant sur l'application des techniques physico chimiques, biochimiques et/ou microbiologiques d'analyses pour la caractérisations physico-chimiques et microbiologiques de certains produits commercialisés par la société AGROMED et GIPA à savoir : Lait frais et ses dérivées.

# Service d'Analyse

## Responsable : Mme. Fatma Rezgui

**Email : fatma_rezgui33@yahoo.fr**

### LISTE DES MEMBRES DU SERVICE ANALYSES :

| Nom et prénom | Grade |
|---|---|
| Mme Fatma REZGUI | **RESPONSABLE DU SERVICE ANALYSES :** Ingénieur Principal |
| Mme Najla MASMOUDI | Ingénieur Principal |
| Mme Lobna JLAIEL | Technicien Principal |
| Mme Nesrine Kchaou | Technicien Principal |
| Mr Kamel Walha | Technicien Principal |

### OBJECTIFS DU SERVICE ANALYSES :

- Offrir toute une panoplie de technologie de pointe afin de promouvoir la Recherche Scientifique au CBS.
- Mettre au point, développer et optimiser des méthodes d'analyses pour mieux répondre aux attentes des chercheurs et à leur exigence en analyse chimique
- Assister les doctorants et chercheurs dans leurs approches analytiques
- Ouverture du CBS sur son monde socio-économique :
- Répondre à certains besoins spécifiques des industriels en leur proposant diverses analyses chimiques et /ou chromatographiques sous formes de prestations obéissant à des normes Européennes et Internationales.

### PLATEFORME DU SERVICE ANALYSES

Les équipements du Service Analyses sont répartis comme suit :

- **PLATEFORME ANALYTIQUE**

| EQUIPEMENT | DATE D'ACQUISITION |
|---|---|
| LC/MS/MS | 2003 |
| GC/MS | 2006 |
| HPLC SERIES 1100 AGILENT TECHNOLOGIES | 2006 |
| HPLC SERIES 1260 AGILENT TECHNOLOGIES DAD/RID | 2013 |
| FPLC BIORAD | 1997 |
| HPLC PREPARATIVE | 2006 |
| HPLC IONIQUE | 2009 |

- **PLATEFORME GENOMIQUE**

| EQUIPEMENT | DATE D'ACQUISITION |
|---|---|
| FLUOROMETRE | 2016 |
| ELECTROPHORESE AUTOMATISEE | 2015 |
| LECTEUR DE PLAQUES PHOTOMETRIQUE/FLUOROMETRIQUE | 2015 |
| SEQUENCEUR HAUT DEBIT MISEQ ILLUMINA | 2015 |
| QPCR EN TEMPS REEL CFX96 | 2015 |
| SPECTROPHOTOMETRE UV/VIS POUR MICROVOLUME NANODROP 2000 | 2013 |
| QPCR ICYCLER OPTICAL | 2010 |
| SEQUENCEUR 4 CAPILLAIRES APPLIED BIOSYSTEMS | 2004 |
| PCR AMPLIFICATEUR DADN GENEAMP | 2004 |

## ➢ IMAGERIE CELLULAIRE

| EQUIPEMENT | DATE D'ACQUISITION |
|---|---|
| CYTOMETRE EN FLUX | 2017 |
| MICROSCOPE CONFOCALE | 2006 |

## ACTIVITES DU SERVICE ANALYSES

L'activité du Service Analyses est divisée en deux volets :

- Recherche et développement
- Prestations de service.

### ✓ RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT

Grace à la compétence du personnel du Service Analyses du CBS et leur maitrise parfaite des équipements de pointes, il en ressort la publication de plusieurs articles parus dans des revues scientifiques impactés :

- Isolation et identification qualitative et quantitative de molécules biologiques à activité antimicrobienne, antifongique, cicatrisante, antioxydante...➡Techniques appliquées : HPLC, GC/MS, LC/MS/MS, FPLC
- Valorisation de la biomasse ➡Techniques appliquées : GC/MS, LC/MS/MS
- Valorisation d'effluents issus de la transformation industrielle : margine, eaux de rejet…➡ Techniques appliquées : HPLC, GC/MS, LC/MS/MS, FPLC
- Séquençage d'ADN : plasmides, cosmides, phages, amplicons ➡ lecture de 600 à 800 pb par migration.
- Séquençage génomique haut débit : d'exome, d'amplicon, de métagénome 16S, de small RNA➡ les lectures peuvent aller jusqu'à 250 nucléotides en single-read ou paired-end, soit un maximum de 7,5 Gigabases lues.

Quelques articles parus dans des revues scientifiques indexées parus en 2017 ayant bénéficiés des prestations internes du Service Analyses **(à titre non exhaustif)** :

https://pubag.nal.usda.gov/catalog/5690639

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27824279

https://doi.org/10.1080/1354750X.2018.1427795

## INVENTAIRE DES ANALYSES EFFECTUEES AU SEIN DU SERVICE ANALYSES AU PROFIT DES DIFFERENTES STRUCTURES DE RECHERCHES DU CBS POUR L'ANNÉE 2017

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

| TYPE D'ANALYSE | NOMBRE DES ANALYSES EFFECTUEES EN 2017 |
|---|---|
| GC/MS | 123 |
| HPLC | 224 |
| FPLC | 133 |
| SEQUENCEUR 4 CAPILLAIRES | 381 |
| SEQUENCEUR MISEQ | 9 RUNS |
| NANODROP | 814 |
| QPCR | 236 |
| QUBIT | 19 |
| BIOANALYSEUR | 156 |
| VARIOSKAN | 112 |
| **TOTAL = 2207** | |

**Tableau 1 :** Inventaire des analyses effectuées au profit des chercheurs du CBS

### ✓ PRESTATION DE SERVICE

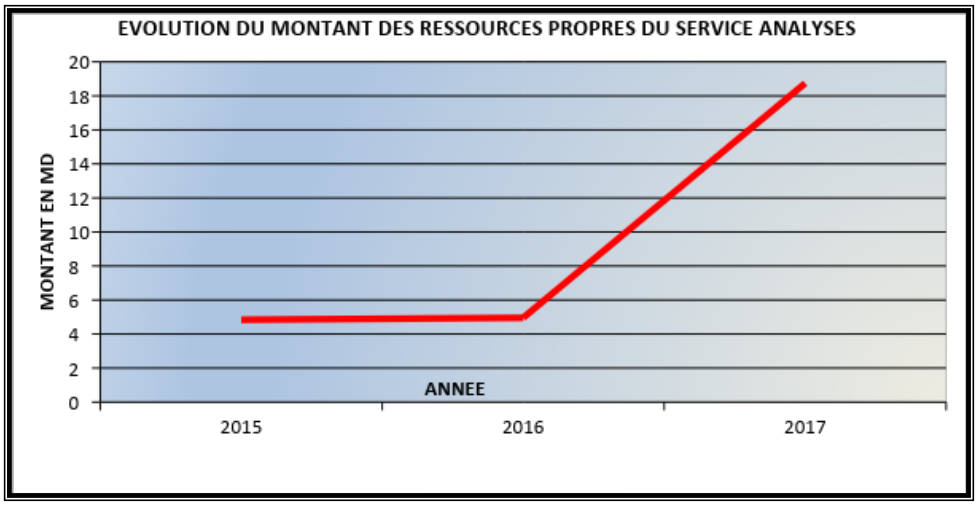
Outre les structures de recherches du CBS qui bénéficient de ces diverses prestations, le Service Analyses effectue aussi des prestations payantes au profit du monde académique et socio-économique.

Les bénéficiaires de ces prestations sont regroupés dans le tableau suivant :

| Bénéficiaire | Type d'analyse | Nombre des analyses |
|---|---|---|
| SIMED | HPLC | 104 |
| LABORATOIRES ALGERIENS | GC/MS | 14 |
| | HPLC | 120 |
| CONFISERIES TRIKI LE MOULIN | HPLC | 20 |
| FMS | GC/MS | 3 |

| | | |
|---|---|---|
| ENIS | GC/MS | 32 |
| | HPLC | 2 |
| FSS | GC/MS | 6 |
| | HPLC | 10 |
| CRRAO | GC/MS | 3 |
| SNPC | GC/MS | 12 |
| | HPLC | 3 |
| **TOTAL = 339** | | |

**Tableau 2 :** Inventaire des analyses effectuées au profit du monde socio-économique




## *CONCLUSION*

Le Service Analyses du CBS 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 Analyses cherche toujours à élargir sa gamme d'équipements analytiques et à renforcer ses compétences humaines.