MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Centre de Biotechnologie de Sfax

RAPPORT D'ACTIVITES

DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX

ANNEE 2018

RA / CBS. 2018

TABLE DES MATIERES

1- Message du Directeur Général 1

2- Présentation générale du CBS 2

3- Effectif du CBS 3

4- Liste des Enseignants Chercheurs / Ingénieurs du CBS 3

5- Membres du Conseil Scientifique 5

6- Budget du CBS 5

7- Equipement lourd du CBS 6

8- Service maintenance 6

9- Coopération Internationale 7

10- Ouverture sur l'environnement 8

11- Production Scientifique 13

12- Journées scientifiques 14

13- Prix et distinctions 14

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

- LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) 15
- LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME) 30
- LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB) 45
- LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes (LBAP) 57
- LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB) 68
- LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) 82
- LR15CBS07 : Laboratoire de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire (LPCMC) 94
- US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches (UVRR) 107
- Service Analyse 119

Message du Directeur Général

En 2018, le CBS se trouve à la fin de son contrat programme (2015-2018), déjà signé le 22 Mai 2015. C'est à travers ses sept laboratoires que le CBS réalise ses différents objectifs et défis à savoir :

- Explorer de nouveaux projets et partenariats en renforçant d'avantage son réseau de coopération internationale (plus de 70 projets internationaux)
- Renforcer son expertise dans le domaine des biotechnologies via la signature d'une vingtaine de conventions avec son milieu socio-économique national et international
- Assurer une production scientifique très respectable (plus d'une centaine de publications/an et cinquantaine de brevets)
- Mériter trois prix présidentiels
- Démontrer son engagement à maintenir son SMQ pour sa 2ème Année.

. De plus, et afin d'améliorer en continue les performances de son système managérial et organisationnel, le CBS envisage, à travers son projet PAQ CR 2S intégrer son SMQ à d'autres systèmes de management afin de:

- Accroître la satisfaction de ses clients et de ses partenaires
- Maîtriser les risques relatifs à la SST,
- Maîtriser des aspects environnementaux
- Démontrer l'aptitude du centre à fournir régulièrement des résultats analytiques fiables et conformes aux exigences normatives et des clients.

En effet, d'une année à l'autre, le CBS a bâti une réputation enviable dans le domaine des Biotechnologies, aussi bien au niveau national qu'international, et continuera de favorablement s'y positionner. Ce défi représente pour moi un engagement à continuer de veiller à ce que le CBS jouera toujours un rôle de chef de file en matière de Biotechnologie. Je ferai de ma priorité le développement et le rayonnement de notre centre en y mettant cœur et dévouement afin que nous atteignions ensemble une visibilité internationale.

J'espère transmettre ma vision à l'ensemble de la famille CBS et ce par le renforcement de : la transparence, l'imputabilité, la qualité du service et l'engagement. Ainsi, j'accorderais la priorité, pendant le prochain Contrat Programme pour les quatre axes suivants :

(i) Recherche-Développement et Innovation,
(ii) Valorisation, Transfert de Technologie et Commercialisation des résultats de la recherche,
(iii) Veille, Communication, Diffusion et Networking
(iv) Accréditation.

Enfin, je remercie chaleureusement le ministère de tutelle pour la confiance qu'il m'accorde en m'octroyant le prix présidentiel 2018 du meilleur laboratoire en termes d'ouverture sur son environnement socio-économique et me confiant la direction générale du CBS (Avril 2019). Sans oublier de remercier tous mes collègues du CBS pour leur soutien et leur confiance.

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 2018:

Projets PAQ (Programme d'Appui à la Qualité de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique) – CBS

Durant 2018, le CBS a bénéficié de deux projets PAQ octroyés par des Fonds compétitifs nationaux (le ministère de tutelle) visant à valoriser la recherche et améliorer l'employabilité des jeunes diplômés à savoir :

Le PAQ-Collabora : Projet collaboratif au sein et autour des technopoles
Le PAQ-Post PFE : Projet pour la valorisation des PFE innovants

Ces projets PAQ suivent le même processus d'attribution des allocations. Des journées d'information de sensibilisation et des ateliers d'assistance technique ont précédé la soumission de chaque Note Conceptuelle (NC). Par la suite, une phase de négociation et de contractualisation a été planifiée après le dépôt de chaque Proposition Complète (PC) des deux projets et leur acceptation.

I-PAQ Collabora

Le projet PAQ Collabora du CBS vise à améliorer la maturité Technologique (augmentation des TRL) des nouveaux bioproduits issus des travaux de recherche du CBS en vue d'une exploitation économique et un transfert de technologie vers le monde socio-économique.
Le projet PAQ Collabora du CBS est intitulé « **Développement de produits biotechnologiques innovants à intérêt industriel »**
Acronyme *:* **Biotech-INNOV**
Durée **: 3 ans**
Budget **: 300.000 DT**

II-PAQ Post -PFE

Le projet PAQ Post - PFE du CBS a pour objectif le développement d'un prototype (kit de diagnostic) ayant un caractère innovant et un impact avéré sur le plan économique et social.
Il est intitulé « **Développement d'un kit d'aide au diagnostic moléculaire de maladies héréditaires dans la population nord-africaine : diminution du coût de diagnostic par échantillon** »
Budget **: 35 000DT**
Durée : **1 an**
Bourse mensuelle/ ingénieur : **(800 DT par mois)**
Durée : **2 ans**

Le CBS a bénéficié d'une avance d'allocation 30.000 DT pour une période de 5 mois en vue de réussir la phase de préalable qui précède la mise en place et la mise en œuvre de son système de management intégré.

Ce rapport d'activités récapitule toutes les activités des différentes structures de R& D du CBS durant l'année 2018 (4ème et dernière 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	2018
Enseignants Chercheurs	48
ingénieurs	17
Corps Technique	37
Administratifs + ouvriers	37
Effectif Total	**137**

Jeunes chercheurs	2018
Chercheurs Postdoc sous contrat CBS	60
Etudiants en thèse	69
Etudiants en mastère	15
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
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	Professeur
Faiçal Brini	Professeur / Directeur d'un laboratoire
Kaïs Jammousi	Professeur
Habib Khoudi	Professeur
Riadh Ben Salah	Professeur
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
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
Adel Tekari	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
Riadh Ben Marzouk	Ingénieur Principal
Fatma Rezgui	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 techniqu

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 en 2018:

Budget provenant du Ministère en DT	Titre I: 488.000,000 DT
	Titre II: 800.000,000 DT
	Equipement technique et administratif pour hall technologique: 125.000,000 DT
	Titre II (Projets des jeunes chercheurs): 40.000,000 DT
	Titre II (Projets PRF): 140.000,000 DT
Secteur économique	58.808,290 DT
Coopération internationale: 1/Projets multilatéraux * 2/ Organismes internationaux** 3/ Projets bilatéraux***	 258.474,500 DT 256.555,470 DT 69.100,000 DT
Coopération internationale (Total)	584.129,970 DT
Total ressources propres (Secteur économique + Coopération internationale)	642.938,260 DT

(*) Un projet européen H2020- MSCA-RISE IPM-4-CITRUS; Un projet Arimnet 2 PYRODIGEST dans le cadre de la

coopération Tuniso-Euromed et et deux projets BIOSMAN et BIOGASMENA de la coopération Tuniso-Euroméditéranéenne « ERANETMED » , un projet LMI COSYS-Med sous tutelle de l'IRD,
(**)The International Centre for Genetic Engeneering and Biotechnology " ICGEB" et USAID (Projet PEER)
(***) 2 Projets PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française ; 2 projets CMPTM dans le cadre de la coopération Tuniso-Marocaine et 2 projets dans le cadre de la coopération scientifique et Technologique Tuniso-Indienne et un projet TRIFOLD dans le cadre de la coopération Tuniso- Allemande

6) Equipements Lourds du CBS

Désignation	Date d'acquisition	Bénéficiaire
Fermenteur 300 L	1983	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche
Sequenceur d'acide Nucléique	2003	Service d'analyse
Molécular Imager	2003	Service d'analyse
Système de Chromatographie HPLC Préparative	2003	Service d'analyse
Ultra Centrifugeuse	2003	Service d'analyse
Spetrometre de masse couplé LC/MS/MS	2003	Service d'analyse
Microscope Confocale	2006	Service d'analyse
Système Bidimentionnel	2006	Service d'analyse
Système de Chromatographie Gaz Liquide	2006	Service d'analyse
Centrifugeuse Continue	2007	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche
Scanner Micro puce	2009	Service d'analyse
Fermenteur 1000 L + 100 L	2009	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche
Fermenteur 20 L	2011	LMB
GCMSMS	2011	LBPE
HPLC	2011	LBPE
système de Séquencage HD	2013	Service d'analyse
Chaudière a vapeur	2013	Unité spécialisée : Valorisation des Résultats de Recherche
Cytométre en Flux	2017	Service d'analyse
Automate d'Extraction des Acides Nucléiques	2018	Service d'analyse

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 2018, le service a effectué les missions suivantes :

- La maintenance corrective de certains appareils scientifiques dans les laboratoires et l'unité de valorisation.

- La maintenance systématique et préventive de tous les Equipements techniques des bâtiments (poste de transformation électrique 800 KVA, compresseur d'air à vis, de la station de traitement des eaux, Centrale de détection d'incendie, le Groupe électrogène et de la climatisation centrale du centre.
- Le suivi d'exécution des contrats de maintenance pour les chambres froides, ascendeur, jardin et le système de détection d'incendie.
- L'élaboration de nouveaux contrats de maintenance pour les Equipements Scientifique
- L'assistance, le suivi et le contrôle de tous les travaux de sous-traitance de maintenances des appareils et des équipements
- Elaboration d'un Programme pour l'étalonnage et le contrôle en interne des instruments de pesage, volume et température et suivi d'application du contrat de maintenance
- Application du programme de la réduction de la consommation d'énergie, la réduction de consommation.
- Lancement des Consultations relatifs à l'entretien des infra structure (Génie civil – peinture – parking – chaussée)

8) Coopération Internationale

Type de la Coopération	Nombre de Projets
Multilatérale	**9**
Bilatérale	**9**
Avec un Organisme International	**3**

a/ Coopération Multilatérale

Durant l'année 2018, Le CBS a été impliqué dans un nouveau projet de coopération multilatérale PYRODIGEST ARIMNET 2 dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed. Par ailleurs, il a continué à entretenir les7 projets actifs depuis 2017 dont :

- ✓ Trois projets H2020 :EXANDAS ; IPM-4-CITRUS et COST financés par la CE dans le cadre de la coopération multilatérale avec l'UE
- ✓ Deux projets BIOSMAN et BIOGASMENA dans le cadre de la coopération Tuniso-Euroméditéranéenne « ERANETMED ».
- ✓ Le projet Tuniso-Japonnais SATREPS.
- ✓ le projet LMI COSYS-Med sous tutelle de l'IRD

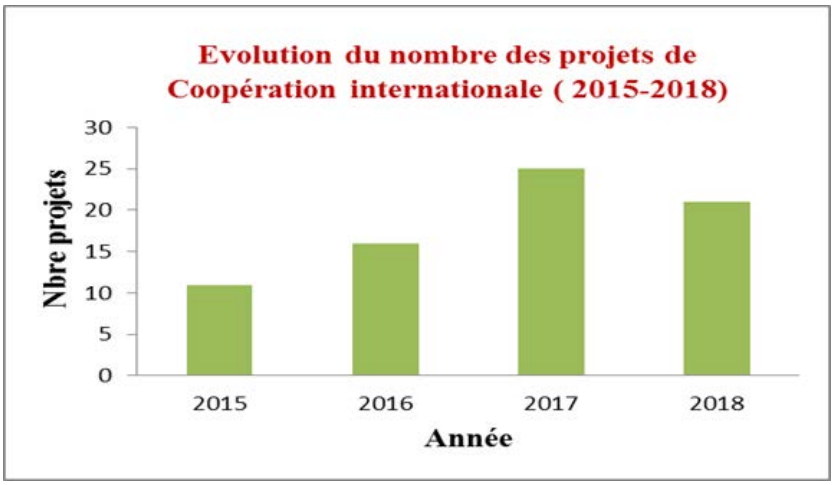
b/ Coopération Bilatérale

Durant l'année 2018, le CBS a continué à entretenir ses projets de coopération bilatérale dont :

- ✓ 2 projets CMPTM dans le cadre de la coopération scientifique Tuniso-Marocaine
- ✓ 2 projets dans le cadre de la Coopération scientifique et technologique Tuniso-Indienne
- ✓ 1 projet PHC-UTIQUE dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française.
- ✓ 1 projet dans le cadre de la coopération Tuniso-Belge(Wallonie-Bruxelles)
- ✓ 2 projets dans le cadre de la Coopération Tuniso-Allemande TUNGER
- ✓ 1 projet TRIFOLD pour le TT et coaching pour start-ups au CBS en coopération avec l'Université de Bremen en Allemagne

c/ Organismes internationaux

Durant l'année 2018, le CBS a obtenu une nouvelle subvention dans le cadre de l'ICEB pour l'organisation de International meetings and courses et a continué d'entretenir le Projet Américain PEER financé par USAID: 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 .



9) Ouverture du CBS sur son environnement national et international

Durant l'année 2018, le CBS a signé un bon nombre conventions avec des partenaires universitaires, socio-économiques ainsi qu'avec l'ANPR dans le cadre de programmes Mobidoc Post –Doc et Doctorants (8 conventions):

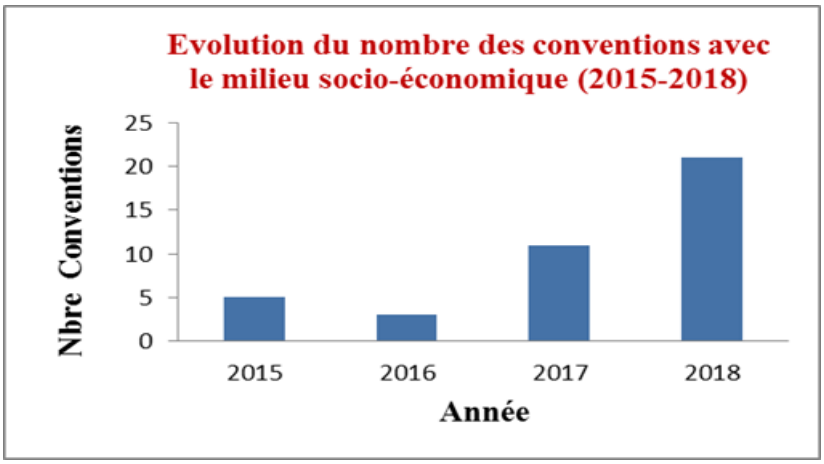
1. **MOBIDOC-POST-DOC 1** :entre le LMB-CBS (docteur Ahlem CHAKCHOIK MTIBAA) et la Société Industriel VITALAG; ***intitulé*** «Développement d'un nouveau produit naturel à base d'engrais organique (Humivital) et de bactériocines (peptides antimicrobiens) à base de bactéries lactiques pour la nutrition et la protection des oliviers».
2. **MOBIDOC-POST-DOC 2** : entre le LMB-CBS (Dr. Imen SELLEM) et la Centrale Laitière de Mahdia VITALAIT; ***intitulé*** «Etude microbiologique, biochimique et physico-chimique de l'instabilité du lait UHT de la marque VITALAIT et installation d'un modèle prédictif de contrôle»
3. **MOBIDOC-POST-DOC 3** : entre le LMB-CBS (Dr. Imen TRABELSI) et la société Tunisienne de Production des Produits Alimentaires STPPA; ***intitulé*** «Fabrication de nouvelles gammes de cafés aromatisés et à base de noyaux de dattes»
4. **MOBIDOC-POST-DOC 4** :entre le LMB-CBS (Dr. Mouna KRIAA) et la Société Industrielle le Bon Gout; ***intitulé*** «Incorporation de l'enzyme glucose oxydase comme un antioxydant et un conservateur dans les produits céréales et étude de son effet sur les propriétés rhéologiques et texturales des produits fabriqués»
5. **MOBIDOC-POST-DOC5** : entre le LMB-CBS (Dr. Sirine BEN SLIMA) et la Société Industrielle Souad Gourmandise; intitulé «Incorporation des polysaccharides et des probiotiques dans la crème et les produits de pâtisserie : Effet sur la qualité des produits reformulés»
6. **Projet MOBIDOC/POST-DOC 6** au nom de Dr. Mouna BEN ELHOUL LBMIE **,** intitulé : « Monter une Start-up « Biotech ECOZYM »: Production d'enzymes écologiques destinées pour les industries de cuir, de textile, de détergence et d'agro-alimentaire »
7. **Projet MOBIDOC/POST-DOC7** au nom de Dr. Wassim BEJAR LBMIE, intitulé : « Production et incorporation d'un cocktail d'enzymes microbiennes (protéases, amylases et peroxydases) dans la formulation du produit de détergent Class de la Société de détergence JMAL « EJM « »
8. **MOBIDOC- Doctorants** (Karima SALEM):entre le LBMIE-CBS et la Société Meunière Tunisienne : "Elaboration d'un complexe enzymatique destiné pour la panification afin d'améliorer les propriétés de transformation de la pâte"

A l'échelle nationale, le CBS a noué deux nouvelles conventions avec des partenaires socio-économiques : 1/ Société industrielle : Jmal **« EJM »** pour les produits d'entretien et 2/ Société **AMAL** de services et de Maitrise des Risques Industrielles. Par ailleurs , il a continué ses collaborations avec les Sociétés industrielles locales suivantes: i)GIPA-AGROMED ; ii)MEDIS ; iii)VIENAT **;** SOTULUB et SEACNVS .

Le CBS a aussi continué de bénéficier de financements du MESRS dans le cadre de programmes de financement de l'innovation (4 PRF et 1 VRR) et a été impliqué depuis 2016 dans un projet PNRI financé par le Minstère de l'Industrie :

- Projet PRF : 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 : 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:'PBMLT: Plateforme Biométrique Multimodale de Prévention contre le Terrorisme.
- Projet PRF : PARADIS: plateforme Big Data pour les allergies alimentaires en Tunisie.
- Projet VRR : 'Kits basés sur des technologies haut débit pour l'aide au diagnostic moléculaire de maladies génétiques chez la population Nord –Africaine.
- Projet PNRI **: «** PNRI Dégraissage-Reverdissage »: Développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de traitement des peaux ovines : reverdissage, épilage-pelanage et dégraissage enzymatiques

A l'échelle internationale, le CBS a noué une nouvelle convention de coopération avec l'université de Sapieza de Rome –Italie et a continué sa collaboration avec L'Institute of Food Technology de Serbie aussi bien qu'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 2018:

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Souad rouis	Citrus	Liban	Du 22 janvier au 02 février
Sami sayadi	CINEA	Espagne	Du 24 au 26 janvier
Slim tounsi	LB	Koweït	Du 27 janvier au 01 février
Ilem hasairi	Citrus	Liban	Du 15 au 26 février
Sonia khoufi	Tuniso /Afric de sud	Afrique du sud	Du 17 au 22 février
Olfa frikha	Tuniso / Indien	Inde	Du 23 février au 01 mars
Fatma driss	Citrus	Liban	Du 01 au 12 mars
Ilem hassairi	Citrus	Liban	Du 05 au 16 mars

Raja gargouri	PHC-Utique	France	Du 13 au 19 mars
Fatma driss	Citrus	Liban	Du 19 au 30 mars
Adel sayari	LBMIE	Finlande	Du 18 au 24 mars
Bassem jaouadi	LBMIE	Finlande	Du 18 au 24 mars
Nadia zeraii	LBMIE	Finlande	Du 18 au 24 mars
Ayda sayari	LBMIE	Finlande	Du 18 au 24 mars
Ilem hassairi	Citrus	Liban	Du 18 au 29 mars
Wafa jallouli	Citrus	Liban	Du 18 au 29 mars
Samir bejar	LBMIE	Finlande	Du 18 au 23 mars
Ahmed rebai	LPCMC	Ouganda	Du 20 au 26 mars
Sami sayadi	Organisme étranger	France	Du 20 mars au 26 avril
Bassem jaouadi	Tuniso / Algérien	Algérie	Du 19 au 30 avril
Slim tounsi	Citrus	Turquie	Du 22 avril au 01 mai
Souad rouis	Citrus	Turquie	Du 22 avril au 01 mai
Olfa frikha	Tuniso / Indien	Malaisie	Du 20 au 24 septembre
Sami sayadi	Organisme étranger	Italie	Du 09 au 12 mai
Slim tounsi	HUPLANTcontrol (COST-H2020)	Serbie	Du 30 mai au 02 juin
Samir ben romdhan	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 17 au 24 juin
Wafa jallouli	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 17 au 24 juin
Moncef mrabet	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 17 au 24 juin
Souad Rouis	ERANETMED/BIOSMAN	Liban	Du 17 au 21 juin
Slim tounsi	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 17 au 24 juin
Sami sayadi	Organisme étranger	France	Du 20 au 22 juin
Mohamed chamkha	LBPE	France	Du 20 au 23 juin
Sami sayadi	Organisme étranger	France	Du 28 au 30 juin

Souad Rouis	LB	France	Du 08 au 14 juillet
Najoua ayadi	Citrus	Liban	Du 18 au 29 juillet
Najoua ayadi	Citrus	Liban	Du 05 au 16 Août
Raida zribi	Citrus	Liban	Du 18 au 29 juillet
Raida zribi	Citrus	Liban	Du 05 au 16 Août
Souad Rouis	Citrus	Liban	Du 03 au 12 septembre
Ilem hassairi	Citrus	Liban	Du 03 au 14 septembre
Ahmed rebaii	LPCMC	Rwanda	Du 16 au 21 septembre
Souad rouis	Citrus	Turquie	Du 01 au 10 octobre
Slim Tounsi	Citrus	Turquie	Du 01 au 10 octobre
Sami sayadi	EXANDAS	France	Du 15 au 20 octobre
Mehdi arbi	PHC-Utique	France	Du 22 au 28 octobre
Mamdouh ben ali	PHC-Utique	France	Du 22 au 28 octobre
Fathi aloui	Biogasmena	Turquie	Du 23 au 27 octobre
Sami sayadi	Biogasmena	Turquie	Du 23 au 27 octobre
Saber masmoudi	LPCMC	Abou Dhabi	Du 23 octobre au 01 Novembre
Riadh ben salah	Tuniso / marocain	Maroc	Du 05 au 24 Novembre
Slim tounsi	Citrus	France	Du 28 Novembre au 01 décembre
Ilem hassairi	Citrus	France	Du 28 Novembre au 01 décembre
Souad rouis	Citrus	France	Du 28 Novembre au 01 décembre
Fatma driss	Citrus	France	Du 28 Novembre au 01 décembre
Nadia marrakchi	Citrus	France	Du 28 Novembre au 01 décembre
Mohamed gerfali	LBME	Algérie	Du 30 Novembre au 04 décembre
Ali gargouri	LBME	Algérie	Du 30 Novembre au 04 décembre
Raja gargouri	PHC-Utique	Portugal	Du 04 au 07 décembre
Mariem ellouze	Tuniso / marocain	Maroc	Du 24 au 29 décembre

B/ Liste des Invités Etrangers en 2018 :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Neha Singh	Tuniso / Indien	Inde	Du 07 au 13 janvier
Gourain Victor	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 22 au 28 avril
Rastegar Sepand	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 22 au 28 avril
Sanjeeva Srivastava	Tuniso / Indien	Inde	Du 19 au 22 juin
Fabrice Armougom	LMI COSYSMED	France	Du 08 au 15 juillet
Maité sylla	PHC-Utique	France	Du 17 au 22 septembre
Amina lisen eddine	Tuniso / marocain	Maroc	Du 17 septembre au 16 octobre
Fabrice Armougom	LMI COSYSMED	France	Du 23 au 29 septembre
Faiçal Azayez	Tuniso / marocain	Maroc	Du 24 au 30 septembre
Jérôme Harmand	LBPE	France	Du 08 au 12 octobre
Heliko Liesegang	ICGEB	Allemagne	Du 04 au 13 novembre
Abdelghani Sghir	ICGEB	France	Du 09 au 13 novembre
Faiçal Azayez	Tuniso / marocain	Maroc	Du 25 au 30 novembre
Tawfik elhakim	Tuniso / marocain	Maroc	Du 25 novembre au 30 décembre
Andrea Wangorsch	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 05 au 07 décembre
Stephan Scheurer	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 05 au 07 décembre
Robert Duran	LBPE	France	Du 16 au 18 décembre
Jean-Jacques Godan	PHC-Utique	France	Du 16 au 18 décembre
Jérôme Harmand	LBPE	France	Du 08 au 12 octobre
Abdallah zine eddine	Tuniso / marocain	Maroc	Du 17 au 23 décembre

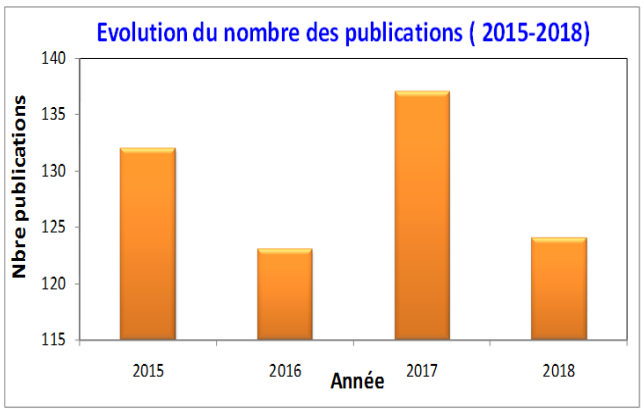
C/ Stages à l'Etranger en 2018:

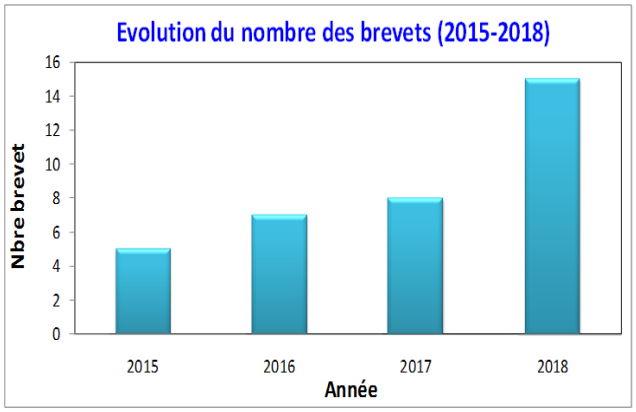
Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Yosra sandi	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 30 janvier au 02 mars
Hela safi	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 01 mars au 31 juillet
Iset bannanou	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 01 au 21 avril

Aycha chouikhi	Tuniso / marocain	Maroc	Du 08 avril au 08 mai
Sawsan naifar	LBMIE	Espagne	Du 01 mai au 31 juillet
Nihel ammous	LBME	France	Du 01 au 05 mai
Fatma abdel moula	LBMIE	France	Du 05 mai au 05 juillet
Sahar salemi	LBAP	France	Du 15 mai au 31 juillet
Ikram zidi	LBAP	France	Du 01 septembre au 28 février
Dorra abdelmlak	LPCMC	France	Du 02 au 15 septembre
Fatma abdel moula	PHC-Utique	France	Du 03 septembre au 15 décembre
Ameni bel haj	PHC-Utique	France	Du 03 septembre au 26 décembre
Karima salem	LBMIE	Italie	Du 10 septembre au 10 novembre
Amal bouzid	Tuniso / Indien	Inde	Du 15 au 30 septembre
Mouna jlidi	LBMIE	Espagne	Du 15 octobre au 30 décembre
Hana triki	LPCMC	France	Du 01 novembre au 31 décembre
Hekma ayadi	CBS	France	Du 05 au 19 novembre
Wafa jalouli	Tuniso / Allemand	Allemagne	Du 05 au 24 Novembre
Rawya boujelben	Tuniso / marocain	Maroc	Du 15 décembre au 14 janvier
Aycha chouikhi	Tuniso / marocain	Maroc	Du 25 décembre 2018 au 25 janvier 2019

10) Production Scientifique en cours de 2018

	2018
Articles, Revues Internationales	**124**
Chapitres d'ouvrages scientifiques	**23**
Brevets nationaux	**-**
Brevets internationaux	**15**
Doctorats et Habilitations Soutenus	**13**
Mastères	**13**
PFE	**2**





11) Les journées scientifiques

1) Participation aux Journées LMI COSYS-Med, Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranéens, Gammarth, 17-18/12/2018.

2) Participation au 2nd meeting du Projet BIOGASMENA, Demonstartion of dry fermentation and optimization of biogastechnology for rural communities in the MENA region, Sfax, 15/05/2018.

3) Organisation dans le cadre du Projet IPM4- Citrus de Conférence et d'un Atelier théorique « Culture for Bioreactors (management, instrumentation, modelling) » le 20 Avril 2018 au CBS- Sfax, Tunisie ,20/4/2018

4) Organisation dans le cadre du projet IPM4-Citrus d'une Table ronde « Acceptability of Biopesticides by civil society», CBS- Sfax, Tunisie ,20/4/2018

5) Organisation d'une formation et Atelier pratique « Cell culture for Bioreactors (management, instrumentation, modelling) » au CBS- Sfax, Tunisie, 24/6/2018 au 30/6/2018

6) Organisation d'un Atelier pratique « Data treatments and bio-kinetics modeling» Octobre 2018 au CBS-Sfax; Tunisie, 24/10/2018 au 27/10/2018

7) Organisation dans le cadre d'une subvention ICGEB d'un cours théorique et pratique « Bacillus thuringiensis genome sequencing: from DNA extraction to annotation through NGS technology, Sfax, Tunisia, 4/11/2018 au 13/11/2018

8) Organisation des 17ème Journées Internationales de Biotechnologie (IDB2018/JIB 2018) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) à Sousse-Tunisie, 20/12/2018 au 23/12/2018

9) Partcipation à l'organisation du 2èmeMaghrebian-Finnish Biotechnology Symposium (MFBS 2018) à Juva-Finlande, 19/3/2018 au 23/3/2018

10) Participation à l'organisation du « 3rd International Conference on Integrated Environmental Management for SustainableDevelopment » ICIEM-3 Tunisia à Sousse, Tunisie, du 2/5/2018 au 5/5/2018

11) Participation à la Conférence Internationale on Multidisciplinary Sciences, 4th éditionMOL2NET 2018*:* CNAM Paris, France, 15/01/2018 au 20/01/2018.

12) Organisation d'un Atelier Zebrafish dans le cadre du projet Tuniso-Allemand TUNGER au CBS- Sfax, Tunisie, du 17/4/2018 au 20 /4/2018

12) Prix et Distinctions

- le prix présidentiel 2018 du meilleur laboratoire en termes d'ouverture sur son environnement socio-économique octroyé à Pr Slim Tounsi , en tant que Chef du Laboratoire des Biopesticides au CBS.

LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)

مخبر الأساليب البيئية

Responsable : Pr. Sami SAYADI

Email : sami.sayadi@cbs.rnrt.tn

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	Qualité	Nom et Prénom	Qualité
Abdelhafidh Dhouib	Professeur (Jusqu'au Juin 2018)	Manel Ben Abdallah	Post-doc
Sonia Khoufi	Maître de conférences	Badreddine Barhoumi	Post-doc
Fatma Karray	Maître assistant	Fatma Hadrich	Post-doc
Mariem Ellouze	M.A.	Hanen Chaari Kharrat	Post-doc
Hatem Zaghden	M.A. (Jusqu'au Juin 2018)	Ahlem Jebali	Post-doc
Zouhaier Bouallegui	M.A.	Amina Maalej	Post-doc
Ines Feki	M.A. (ISB-Sfax)	Ines Dahmen	Post-doc
Nozha Abid	M.A. (FS-Sfax)	Asma Mahmoudi	Doctorante
Fathi Aloui	Ingénieur général	Emna Feki	Doctorante
Firas Feki	Ingénieur général	Maha Affes	Doctorante
Mohamed Ali Masmoudi	Ingénieur en chef	Dorra Hentati	Doctorante
Manel Hamza	Technologue (ISET-Sfax)	Mariem Jeddi	Doctorante
Sirine Choura	Ingénieur contractuel	Mokhles Kouas	Doctorant
Najla Mhiri	Technicien principal	Mouna Kehili	Doctorante
Slim Loukil	Technicien principal	Sabrine Ben Ouada	Doctorante
Nidhal Baccar	Technicien	Hana Zouch	Doctorante
Sonia Kchaou	Technicien	Meriam Cheffi	Doctorante
Manel Chelbi	Technicien contractuel	Raouia Boujelben	Doctorante
Fatma Ben Amor	Technicien contractuel	Najoua Kallel	Doctorante
Selma Kchaou	Assistante de gestion	Imen Siala	Doctorante
Omar OULED EL FARHANI	Ouvrier contractuel	Imen Halouani	Doctorante
		Wiem Elloumi	Doctorante

OBJECTIFS GENERAUX ET SPECIFIQUES:

L'expertise en biotechnologie de l'environnement du Laboratoire LBPE peut être résumée dans le développement des procédés aérobies et anaérobies, ainsi que les procédés MBR et l'isolement et la caractérisation de nouvelles souches microbiennes 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 :

- 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, et des biosurfctants.

Les travaux réalisés durant l'année 2018 entrent dans le cadre des 5 projets, cités ci-dessous. Nous présentons dans ce rapport quelques exemples d'activités.

LISTE DES PROJETS

1- Projet 1: Traitement et valorisation des rejets (*Pr. Sami SAYADI*)
2- Projet 2 : Bioremédiation: B i o d é g r a d a t i o n des hydrocarbures, biosurfactants et biodiversité microbienne (*Pr. Mohamed CHAMKHA*)
3- Projet 3 : Production de biomasse et de molécules d'intérêt ou élimination de polluants par culture des microalgues: (Pr. *Abdelhafidh DHOUIB*)
4- Projet 4 : Etude de la digestion anaérobie pour le traitement et la valorisation énergétique des déchets organiques solides: (*Dr. Sonia KHOUFI*)
5- Projet 5 : Evaluation de risques environnementaux et valorisation de bio-ressources: (*Dr. Zouhaier BOUALLEGUI et Prof. Sami SAYADI)*

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS :

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

-Traitement des effluents de tanneries par des approches intégrées:

Le secteur du cuir, y compris l'industrie de tannage, est l'une des principales sources de pollution industrielle. La majorité des opérations des tanneries, effectuées en milieux aqueux, utilisent et consomment plusieurs produits chimiques, engendrant une pollution de l'eau. Cette pollution tant organique que minérale génère une toxicité importante qui peut être causée par les sels, les composés soufrés ou encore par les métaux lourds, essentiellement le chrome. Le Cr est toujours présent avec des concentrations très élevées dans les effluents de tanneries, essentiellement dans l'effluent de tannage. De ce fait, nous avons opté dans cette partie du travail pour une étude de l'adsorption du Cr. Pour ce faire, des tests préliminaires ont été réalisés afin de sélectionner les adsorbants les plus performants permettant une élimination maximale du Cr. Ainsi, trois adsorbants inorganiques (le marbre en poudre, l'écorce des agrumes en poudre et la sciure) et trois adsorbants biologiques (*Trametes versicolor, Ganoderma lucidum* et *Pycnoporus coccineus)* ont été testés. Le choix de l'adsorbant le plus efficace était basé sur le rendement d'élimination du Cr.

Les tests préliminaires en utilisant différentes doses d'adsorbants ont montré que le marbre en poudre et *P. coccineus* sont les adsorbants les plus efficaces. Le taux d'élimination du Cr est proportionnel à la quantité d'adsorbant. Ce taux a atteint sa valeur maximale (environ 100%) en présence de 6% du marbre en poudre et 52% en présence de 30% de pellets de *P. coccineus.* Cela est attribué à l'augmentation des surfaces de l'adsorbant, augmentant, ainsi, le nombre de sites d'adsorption disponibles. Vu que le temps d'incubation est l'un des indicateurs de la cinétique de transfert d'absorption de la phase liquide à la surface de l'adsorbant, l'effet du temps de contact sur le rendement d'élimination du Cr a été aussi étudié. Les résultats de ce suivi ont montré que l'équilibre d'adsorption a été obtenu après 30 min pour le marbre en poudre et 48 h pour *P. coccineus*. De plus, l'élimination du Cr était faible à des pH acides (2 et 3). Par contre, à pH plus élevé, l'élimination du Cr était beaucoup plus importante. Suite aux résultats obtenus, nous avons opté pour un plan d'expérience «Box-Benhken» afin d'optimiser les conditions aboutissant à une élimination maximale du Cr et ce pour les deux adsorbants. Pour ce faire, trois facteurs ont été choisis: la concentration initiale en Cr, le pH et la dose d'adsorbants.

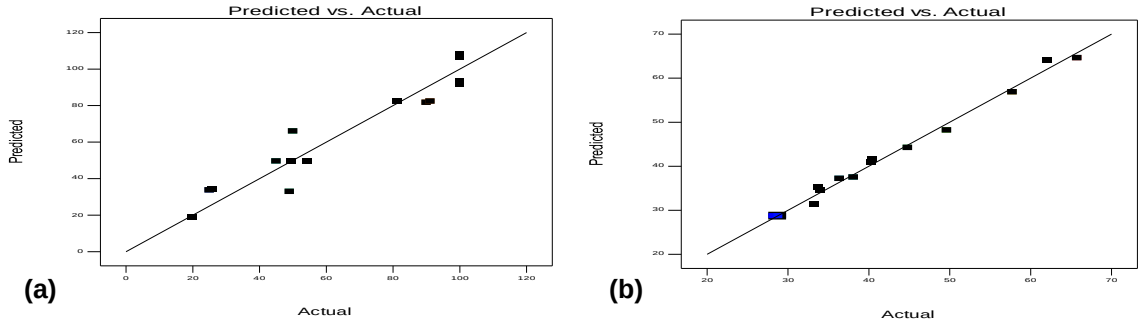


Fig. 1. Diagramme de dispersion de la réponse prévue par rapport à la réponse réelle pour l'élimination du Cr de l'effluent de tannage par le marbre en poudre (a) et par *P. coccineus* (b).

Selon les résultats obtenus, nous avons constaté que le modèle statistique a montré des résultats satisfaisants dans les deux plans réalisés. De plus, la validité du modèle dans les deux cas, en tenant compte de l'analyse de la variance et de la régression, est jugée très bonne **(Fig. 1)**. En outre, les modèles obtenus montrent bien que pour *P. coccineus*, la concentration initiale du Cr affecte énormément le rendement d'élimination. Pour le marbre en poudre, cette élimination était plutôt influencée par la dose et le pH.

- **Ecologie moléculaire structurale et fonctionnelle d'un environnement hypersalin:**

Chott El Jerid est une dépression fermée dont l'aspect naturel change selon la saison. La diversité structurale des populations procaryotiques (bactéries et archées), présentes dans les eaux et les sédiments du Chott prélevés à la fin de la saison sèche a été étudiée (Ben Abdallah et al., 2016). Cependant, l'étude de la biodiversité microbienne durant la saison pluvieuse reste inexplorée. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité des populations procaryotiques, des populations méthanogènes et des bactéries sulfato-réductrices présentes dans les échantillons prélevés du Chott en saison pluvieuse au niveau du site 1 (S3-14, S4-14, S5-14) et site 2 (S6-14 et S7-14), en utilisant les techniques moléculaires (DGGE, QPCR, Illumina Miseq) ciblant le gène de l'ARN ribosomal 16S et les gènes de fonctions métaboliques (*mcrA* et *dsrB*), respectivement.

Les analyses à haut débit des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S ont montré que les bactéries sont dominées par *Proteobacteria* (93-98,8%) (surtout les espèces *Ralstonia*), suivies par *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* et *Verrucomicrobia* (**Fig. 2a**). Au sein de la classe *Betaproteobacteria*, les membres du genre *Ralstonia* sont présents dans tous les échantillons du Chott et sont impliqués dans la bioremédiation du sol et des eaux contaminés par des composés aromatiques ou encore des métaux lourds. Au sein de la classe *deltaproteobacteria*, la majorité de séquences appartenant aux bactéries sulfato-réductrices sont regroupées sous l'ordre des *Desulfobacterales*, *Desulfarculales* et *Desulfovibrionales*. Les membres appartenant aux ordres *Desulfobacterales* et *Desulfovibrionales* ont été aussi détectés dans le Chott par la technique DGGE en se basant sur les séquences d'acides aminés de la sous unité du sulfite réductase dissimilatrice (*dsr*B) et sur le gène codant pour l'ARNr 16S. Dans le domaine des archées, les résultats obtenus par les amorces universelles prokaryotiques ont montré un faible nombre des OTUs affiliés aux familles *Methanosarcinaceae*, *Methanomassiliicoccaceae* et la présence des archées sulfato-réductrices affiliées au genre *Archaeoglobus*. Cependant, les résultats obtenus par les amorces spécifiques des archées ont montré que la plupart des séquences sont affiliées au phylum *Euryachaeota* (99,9 % dans chaque échantillon) et sont regroupées à la classe *Halobacteria*

(surtout les espèces des *Halorubrum*) (**Fig. 2b**). Les analyses ont montré aussi la présence des membres du genre *Halohasta* dans cet écosystème. Le séquençage haut débit nous a permis de décrire finement la structure de ces communautés très diversifiées déjà prouvée par nos précédentes approches bas-débit (DGGE et QPCR).

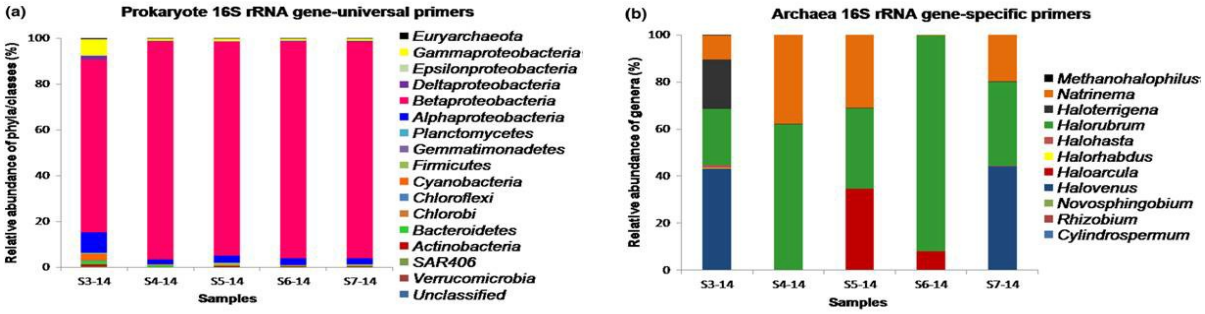


Fig. 2. Abondance relative des taxons procaryotiques pour chaque échantillon.

<u>Projet 2</u>: Bioremédiation: Biodégradation des hydrocarbures, biosurfactants et biodiversité microbienne (Responsable: Pr. Mohamed CHAMKHA)

- **Etude de la composition microbienne (Bacteria et Archaea) des échantillons marins en utilisant des techniques de séquençage haut-débit:**

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études sur les communautés microbiennes dans les environnements marins ont été réalisées, en utilisant des approches métagénomiques basées sur le séquençage massif haut-débit, afin d'explorer la diversité et la composition des communautés à partir de diverses régions océaniques du monde. Dans ce contexte, une analyse métagénomique de certains échantillons marins de notre étude (sédiment et eaux), en utilisant des techniques de séquençage massif ou NGS (Pyroséquençage et Illumina MiSeq), a été réalisée. Cette méta-analyse a pour but d'explorer la diversité procaryotique dans les échantillons marins contaminés par des hydrocarbures et de définir des consortia microbiens indicateurs de cette contamination.

La technique moléculaire de pyroséquençage a été appliquée sur un sédiment marin contaminé par des hydrocarbures et provenant du port de pêche de Sfax afin d'avoir une idée sur la phylogénie des espèces microbiennes (*Bacteria* et *Archaea*) présentes dans ce biotope. Les résultats montrent la dominance du domaine *Bacteria* (97% de séquences) par rapport au domaine *Archaea* (1% de séquences). Un pourcentage de 2% des séquences obtenues ne sont assignés à aucun des phyla connus. Le phylum *Proteobacteria* représente environ 73% de la totalité des séquences (composé des classes de *Gammaproteobacteria* (31%), *Deltaproteobacteria* (24%), *Epsilonproteobacteria* (11%), *Alphaproteobacteria* (5%) et *Betaproteobacteria* (2%)). D'autres phyla sont présents à différentes proportions comme: *Bacteroidetes* (5%), *Chloroflexi* (4%), *Spirochete* (3%) et *Actinobacteria* (2%) (**Fig. 3**).

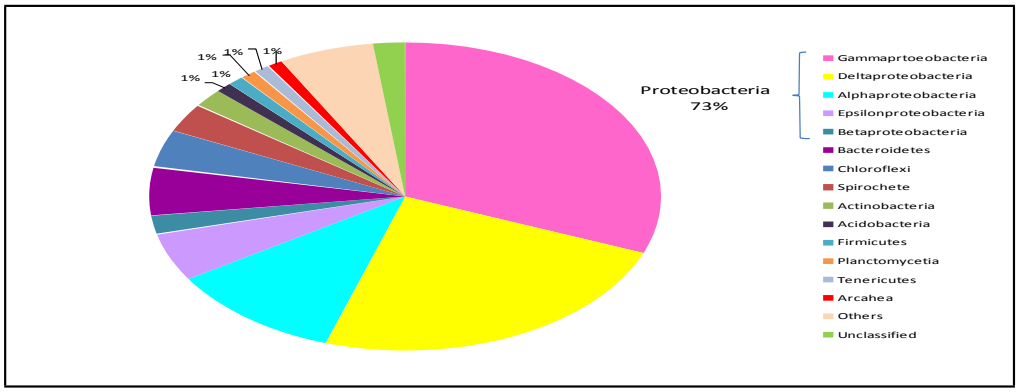


Fig. 3. Biodiversité procaryotique du sédiment marin contaminé
par des hydrocarbures provenant du port de pêche de Sfax (Phylum/Classe).

Ces résultats sont en concordance avec plusieurs études antérieures analysant la diversité microbienne au sein des sédiments de surface côtiers contaminés par des hydrocarbures. Une dominance du phylum *Proteobacteria*, en particulier des classes *Gamma* et *Delta*, est évidente dans les sédiments marins contaminés par des hydrocarbures. Les *Deltaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*, qui dominent l'échantillon de sédiment étudié, sont très connues pour être les clades dominants dans les sédiments marins et englober un grand nombre de souches capables de dégrader les hydrocarbures appartenant aux genres *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, etc…

- **Biodégrdation des hydrocarbures et production des biosurfactants:**

Deux nouvelles souches bactériennes marines aérobies ont été isolées et retenues pour la poursuite de notre étude: PYR2 et CO100 isolées à partir des sédiments marins provenant du port de pêche de Sfax, après des enrichissements sur le pyrène et le pétrole brut, respectivement. La souche PYR2 montre sa capacité de croître sur le pyrène, un HAP composé de 4 noyaux aromatiques, en l'absence de l'extrait de levure et en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C. Les caractérisations phénotypiques et phylogénétiques montrent que la souche PYR2 est étroitement reliée à l'espèce *Bacillus licheniformis* (similarité de l'ARNr 16S de 99%). Les analyses GC-FID montrent que la souche PYR2 est capable de dégrader 42,1% du pyrène (200 mg/l) au bout de 30 jours d'incubation. La souche CO100, membre du genre *Staphylococcus*, montre des potentialités biodégradatives intéressantes sur le pétrole brut (1%, v/v) présent dans le milieu minimum, sans l'ajout de l'extrait de levure et en présence de 100 g/l NaCl. Les analyses GC-MS prouvent que la souche CO100 est capable de dégrader 72% des hydrocarbures aliphatiques présents dans le pétrole brut (1%, v/v), au bout de 20 jours d'incubation à 37 °C. La souche CO100 montre, également, une capacité remarquable de croître sur d'autres sources de carbone (phénanthrène, fluoranthène, pyrène, mazout…).

Ces deux souches PYR2 et CO100 montrent une grande capacité à produire des biosurfactants sur la plupart des substrats testés. Les biosurfactants produits appartiennent à la famille des lipopeptides. La souche PYR2 produit des des lichenysines (**Fig. 4**), alors que la souche CO100 produit des iturines et des lichenysines. L'évaluation de la cytotoxicité des biosurfactants bruts montre que BS-PYR2 et BS-CO100 ne présentent pas d'effet toxique, à des concentrations inférieures ou égales à 200 µg/ml et 1000 µg/ml, respectivement. Par ailleurs, l'application des biosurfactants, BS-PYR2 et BS-CO100, dans la remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée, a montré qu'ils sont plus efficaces que des tensioactifs chimiques testés dans les mêmes conditions.

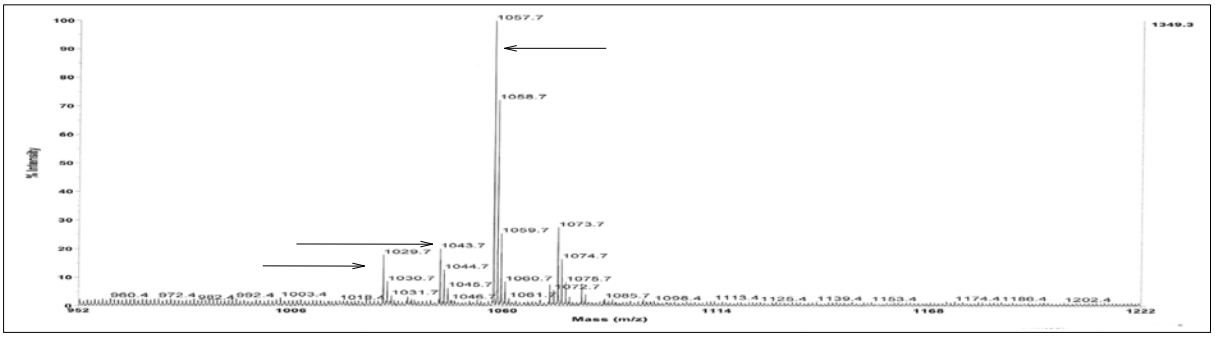


Fig. 4. Spectre de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche PYR2.

<u>Projet 3</u> : Production de biomasse et de molécules d'intérêt ou élimination de polluants par culture des microalgues (Responsable: Pr. Abdelhafidh DHOUIB)

Dans le but de produire des biocarburants, quatre souches micro-algales (WT1, WT3, WT4 et WT7) ont été isolées du nord-est de la Tunisie. La caractérisation morphologique et moléculaire de ces isolats a démontré que ces micro-algues appartiennent aux genres *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Amphora* et *Nitzschia*, respectivement. L'étude de la production de ces micro-algues en mode semi-continu a été réalisée dans des photo-bioréacteurs à bulle à différents taux de dilution (**Fig. 5**).

Fig. 5. Culture des microalgues isolées dans les photo-bioréacteurs à bulle.

Des expériences en mode semi-continu à des taux de dilution allant de 0,08 à 0,90 1/jour ont été réalisées. La diatomée *Amphora* sp. (Souche WT4) a présenté une très faible concentration de biomasse au cours de la première phase ainsi que des difficultés de culture opérationnelles de sorte qu'elle n'était plus cultivée en mode semi-continu. L'influence du taux de dilution sur la productivité de la biomasse pour les trois autres souches est présentée dans **Fig. 6**.

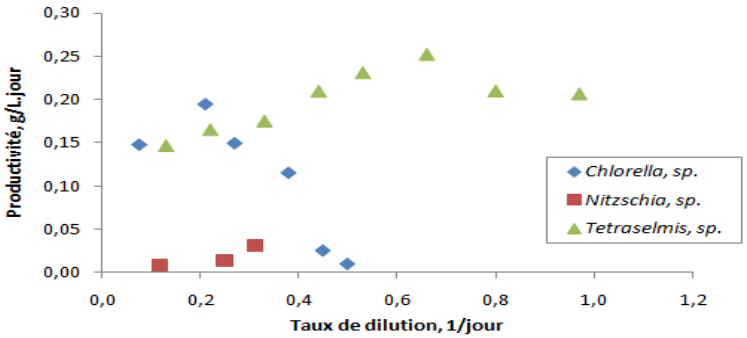


Fig. 6. Effet du taux de dilution sur la productivité des micro-algues Cultivées dans des photo-bioréacteurs.

Les productivités en biomasse pour *Tetraselmis* sp. et *Chlorella* sp.se situaient entre 0,15-0,25 g/l.jour et 0,01-0,20 g/l.jour, respectivement. En revanche, des productivités en biomasse de seulement 0,01-0,07 g/l.jour ont été déterminées pour *Nitzschia* sp. La productivité maximale en biomasse (0,25 g /L. jour) a été obtenue avec *Tetraselmis* sp. à 0,6 1/jour.

La composition biochimique de la biomasse produite par chaque micro-algue étudiée a été évaluée. Les résultats ont révélé que la teneur en protéines dépend de la souche et varie d'un genre à l'autre. La teneur en protéines de *Tetraselmis* sp. a varié de 16,70 à 19,30% MS, avec une légère augmentation (jusqu'à 21,60% MS) qui a été constatée à 0,40 1/jour. En ce qui concerne *Chlorella* sp., la teneur en protéines a été presque constante (25,60-28,10% MS) aux trois premiers taux de dilution, puis a diminué constamment à mesure que le taux de dilution augmentait, jusqu' à 12,80% MS à 0,50 1/jour. Une tendance différente a été observée pour *Nitzschia* sp., la teneur en protéines a augmenté lorsque le taux de dilution augmentait de 15,10 à 20% MS, avec une légère diminution à 0,25 1/jour. Concernant les lipides, la teneur totale a varié de 12,30 à 17,90% MS pour *Chlorella* sp. et la productivité se

situait dans l'intervalle de 1,70 à 35,10 mg/l.jour. Le maximum (17,90%, 35,10 mg/l.jour) a été enregistré à 0,20 1/jour. *Nitzschia* sp. a démontré une capacité notable d'accumulation de lipides (20,60 à 30,70% MS), qui diminuait lorsque le taux de dilution augmentait.

La teneur et le profil en acides gras variaient considérablement entre les différents isolats et aucune tendance spécifique n'a été observée en ce qui concerne les différents taux de dilution appliqués. La teneur la plus élevée en esters méthyliques d'acide gras (EMAG) a été observée pour la diatomée *Nitzschia* sp. (81,40%). Les acides gras palmitique et palmitoléique étaient les acides gras prédominants dans la plupart des extraits de micro-algues, suivis des acides gras C18: 3n3, C18: 1n9, C16: 4n1 et C16: 3n4. *Chlorella* sp. contenait une teneur élevée en C18: 3n3 dans la plage de 9,30 à 30% du total des acides gras. La plus grande quantité de C16: 1n7 a été attribuée à la diatomée *Nitzschia* sp. (47,70% du total des acides gras à 0,10 1/jour), alors qu'une quantité considérable de C18: 1 (2,50 à 30,90% du total des acides gras) a été obtenue auprès de *Tetraselmis* sp. Il convient de noter que parmi tous les isolats, seule *Nitzschia* sp. a présenté de grandes classes d'acides gras appartenant à des espèces plus légères, telles que C: 14 (6,30 à 7,60% des acides gras totaux) et à des espèces plus lourdes telles que C22: 5 (7,70 à 13% des acides gras totaux).

En conclusion, quatre micro-algues ont été isolées et identifiées: *Tetraselmis* sp., *Chlorella* sp., *Amphora* sp. et *Nitzschia* sp. Trois isolats ont été cultivés avec succès en mode semi-continu à différents taux de dilution dans des conditions du laboratoire simulant les conditions extérieures, afin d'évaluer leur potentiel de production de biocarburants. *Chlorella* sp. a démontré la meilleure performance: à 0,20 1/jour, une productivité lipidique de 35,10 mg /l.jour a été déterminée alors qu'à 0,3 1/jour, une productivité en EMAG de 20,30 mg/l. jour a été obtenue, avec un profil d'acides gras favorable à la production de biocarburants.

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

Parmi les travaux réalisés dans le cadre de ce projet, l'étude de la co-digestion de la fraction fermentescible des ordures ménagères (FFOM) avec la fiente de volaille (FV) a été développée. Pour ces substrats, une caractérisation basée sur l'extraction chimique séquentielle et la spectroscopie à fluorescence a été réalisée afin de déterminer les fractions bio-disponibles, bio-accessibles et biodégradables. Des essais de co-digestion en batch de FFOM avec la FV et l'inoculum anaérobie (INO) ont été réalisés avec différentes combinaisons déterminées selon le plan de mélange (mixture design). Le volume de méthane cumulé des différents batchs était significatif dès le premier jour de la digestion. De plus, la production du méthane a été améliorée par l'ajout de l'inoculum aux deux substrats. Pour prédire statistiquement la meilleure combinaison des différents substrats testés (FFOM, FV, INO), le modèle QUARTIC a été appliqué. L'analyse de la variance a permis de confirmer la validité du modèle. Les résultats ont montré qu'une production de méthane de l'ordre de 360 L/kg MV peut être obtenue en combinant 21,8% FFOM, 44,4% FV et 33,8% INO.

En se basant sur ces résultats, nous avons mené une étude pour évaluer la co-fermentation sèche de ces déchets dans un réacteur hybride à percolât. La caractérisation physico-chimique des substrats a montré que la FFOM est potentiellement riche en carbone avec un rapport C/N élevé (126,8). Ce rapport a été corrigé par l'ajout de FV (C/N = 28). La détermination du potentiel méthane des substrats (Test BMP) et leur caractérisation par la méthode de fractionnement, suivie par une analyse fluorescente, ont montré une corrélation de la cinétique de la biodégradabilité et du rendement avec l'accessibilité et l'indice de complexité. L'approche expérimentale à petite échelle a montré une amélioration du rendement biogaz par

l'application de la méthode de co-digestion. Le rendement a augmenté de 627 à 717 L/kg MV.

Dans une autre partie de ce travail, nous avons conduit une co-fermentation sèche dans un réacteur biphasique avec recirculation du lixiviat. Le suivi des différents paramètres a monté une stabilité du système anaérobie due aux conditions opérationnelles optimales de la fermentation (pH, rapport C/N, indice de complexité) et à la richesse de l'inoculum en méthanogènes. Ceci a aboutit à un rendement de biogaz (770 L/kg MV) plus élevé que celui obtenu lors de test BMP (717 L/kg MV) (**Fig. 7**).

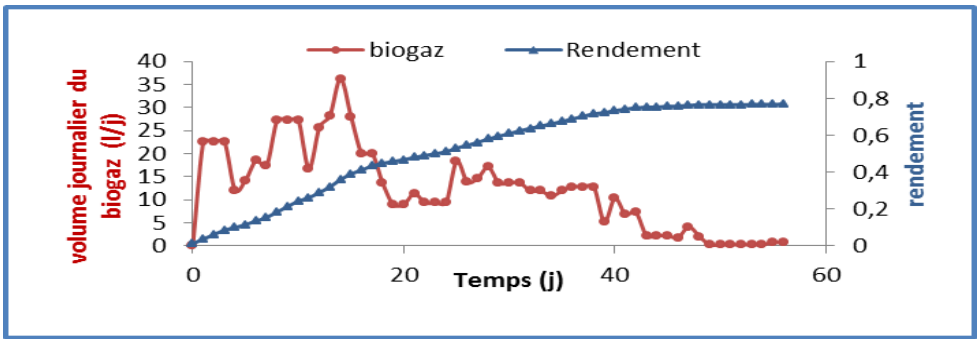


Fig. 7. Evolution journalière du volume et du rendement cumulé en biogaz au cours de la digestion anaérobie en réacteur hybride

La percolation du digestat à travers le substrat lors de la digestion anaérobie a aboutit à son enrichissement en éléments fertilisants (azote et phosphore). Cet enrichissement est du à la composition initiale des substrats qui sont riches en ces éléments minéraux. L'analyse de la toxicité des digestats produits a été effectuée et les résultats ont montré que les digestats ont un caractère fertilisant.

En outre, nous avons évalué le caractère fertilisant du digestat issu de la méthanisation de la FFOM en le comparant avec le jus de compost. L'application du digestat sur des plantes de haricot a montré que le digestat testé, dans des conditions de serre et de terrain, a amélioré la croissance et le rendement de l'haricot, en comparaison avec les résultats obtenus par le jus de compost, qui est un fertilisant biologique conventionnellement utilisé dans les champs (**Fig. 8**). Par ailleurs, le mélange du digestat stabilisé avec le jus de compost a donné des effets similaires et même meilleurs que les digestats et le jus de compost appliqué seul. Les résultats soutiennent l'opinion que les digestats peuvent être utilisés comme fertilisant au sol améliorant, ainsi, les paramètres de croissance, de rendement et de qualité des cultures.

Fig. 8. Effet de la fertilisation des différentes solutions (JC+DS; DB; DS et JC) sur les plantes de haricot vert, 50 jours après repiquage (JC: jus de compost; DS: digestat stabilisé; DB : digestat brut; JC+DS: mélange de jus de compost et de digestat stabilisé; et Témoin: eau).

Dans un autre volet de travail, les déchets organiques y compris les déchets lignocellulosiques issus des activités de jardinage ou agro industriels (gazons, feuilles mortes, branches issus de l'élagage ou de taille) posent des problèmes sérieux pour l'Homme

et l'environnement d'où le recours à une gestion durable de ces déchets. La caractérisation des déchets lignocellulosiques de jardin montrent qu'ils présentent un pourcentage très élevé de matière sèche qui est en quasi-totalité sous forme de matière organique, une DCO de l'ordre de 3,6 g/l, et une concentration élevée en polyphénols dépassant les 5 g/l. Ces déchets sont également caractérisés par une forte teneur en azote et en métaux lourds.

Pour solubiliser la matière organique complexe de ce type de déchet et afin d'améliorer le bilan énergétique de leur digestion anaérobie, le prétraitement enzymatique s'est montré efficace, sans danger, et surtout économique, puisque les déchets ont été utilisés comme seule source de carbone et d'énergie. Afin de prédire statistiquement les meilleures conditions de production enzymatique et de solubilisation de la matière lignocellulosique par utilisation du procédé de la fermentation en milieu solide (FMS) et la fermentation submergée en milieu semi solide (FMSS), le modèle Quatric a été appliqué. La validité du modèle appliqué a été confirmée par l'analyse de la variance. La production de laccases, en utilisant la fermentation en milieu solide (FMS), a permis une solubilisation de la matière lignocellulosique traduite par augmentation des teneurs en sucres réducteurs et en $DCO_{soluble}$, atteignant des pourcentages de l'ordre de 85%. En outre, la production de cellulases, par fermentation en milieu semi solide ou submergée (FMSS), a permis une solubilisation de la matière lignocellulosique, en particulier la cellulose. Ceci a été traduit par une augmentation des teneurs en sucres réducteurs et en $DCO_{soluble}$, correspondant à des pourcentages de solubilisation supérieurs à 80%.

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

Dans le cadre de l'exploitation des sous-produits des plantes aromatiques dans le développement de nouveaux produits innovants à forte valeur ajoutée dans le domaine des cosmétiques et des suppléments alimentaires, nous nous sommes consacré dans une partie du travail à l'étude de l'effet anti-tumoral des extraits moyennant la technique de culture cellulaire. L'effet antiprolifératif des différents extraits préparés a été évalué en premier lieu sur des cellules saines des reins à savoir les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney cell line) et en second lieu sur des cellules cancéreuses B16 (mouse melanoma cells) en déterminant le nombre de cellules viables moyennant le test MTT (cell viability test). Des concentrations d'extrait allant de 0 à 80 µg/ml pour les cellules HEK293 et de 0 à 50 µg/ml pour les cellules B16 ont été étudiées.

Les résultats ont montré que l'extrait de pélargonium (P) possède des valeurs de IC_{50} de l'ordre de 30 et 50 µg/ml et que l'extrait de Rosa Canina (RC) possède des valeurs de IC_{50} de l'ordre de 15 et 35 µg/ml, suite à un traitement de 48 h des cellules HEK293 et B16, respectivement (**Fig. 9**).

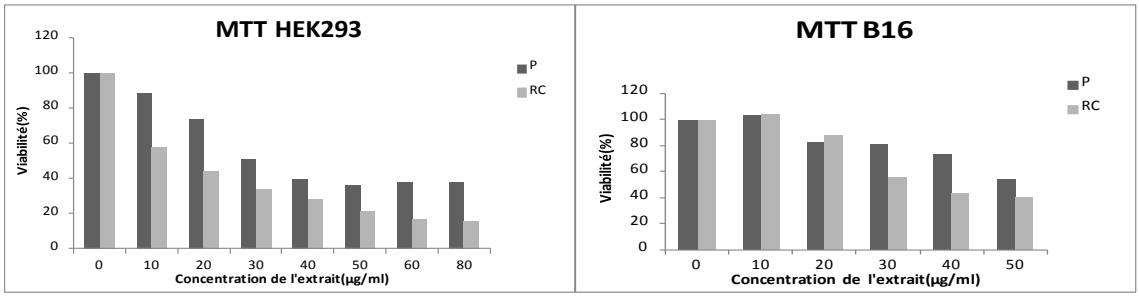


Fig. 9. Tests de viabilité cellulaire des cellules HEK293 et B16 en utilisant des extraits P (Pélargonium) et RC (Rosa Canina).

Des concentrations non toxiques des extraits ont été retenues pour le dosage de la tyrosinase intracellulaire au niveau des cellules B16. Le dosage a montré une diminution de l'activité de cette enzyme de 55% et 15%, à une concentration de 35 µg/ml de l'extrait P et l'extrait RC, respectivement. Par la suite, nous avons mesuré le taux de mélanine qui a montré une diminution significative à cette même concentration, pour les deux extraits.

Le dosage des espèces réactives oxygénés (*reactive oxygen species ROS)* a été effectué sur des cellules HEK293 et a montré que les deux extraits, à une concentration de 10 µg/ml, diminuent de 60% le taux de ces ROS au niveau des cellules.

En outre, les activités anti-tyrosinase et anti-élastase de l'extrait P, ainsi que ses fractions obtenues par CPC (*centrifugal partition chromatography*), ont été évaluées moyennant des dosages enzymatiques. Parmi les différentes fractions, F1 et F8 ont montré une inhibition significative de l'activité tyrosinase de 60 et 52%, respectivement, à 10 µg/ml. En revanche, ces pourcentages d'inhibition ont été obtenus à des concentrations de 32 et 25 µg/ml avec l'extrait P (**Fig. 10**). De plus, les fractions F2 et F9 ont montré une inhibition importante de l'activité anti-élastase de 81 et 71%, respectivement, à 10 µg/ml. Par contre, ces pourcentages d'inhibition ont été obtenus à des concentrations de 9,9 et 8,1 µg/ml (**Fig. 11**).

L'analyse par GC-MS de l'huile essentielle de Rosa Canina a révélé la présence de différents composés tels que, citronellol, géraniol, néral et majoritairement l'eugénol.

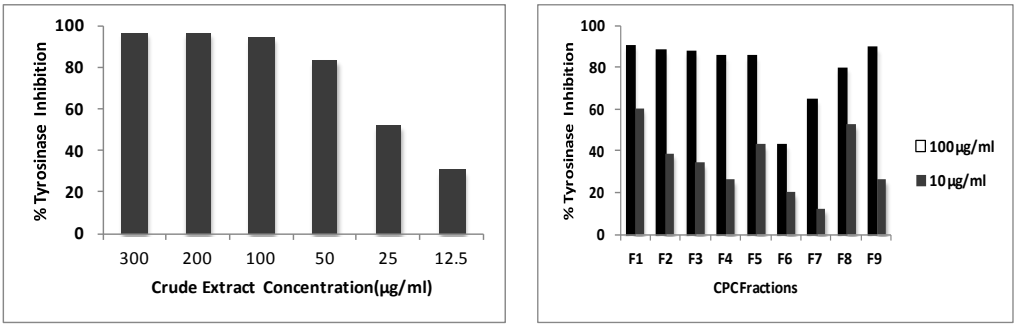


Fig. 10. Dosage de l'activité anti-tyrosinase au niveau de l'extrait P et ses fractions de CPC.

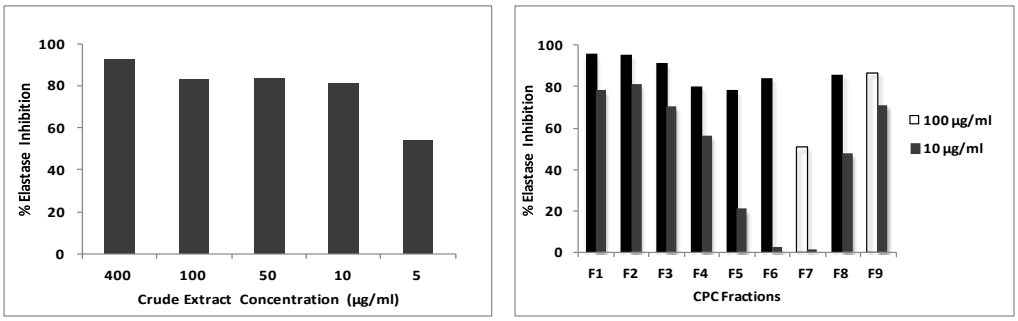


Fig. 11. Dosage de l'activité anti-élastase au niveau de l'extrait P et ces fractions de CPC.

Production scientifique

- Publications parues en 2018 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture:

[1]. Ben Abdallah, M., Karray, F., Kallel, N., Armougom, F., Mhiri, N., Quemeneur, M., Cayol, J. L., Erauso, G., & Sayadi, S., **2018**. Abundance and diversity of prokaryotes in ephemeral hypersaline lake Chott El Jerid using Illumina Miseq sequencing, DGGE and qPCR assays. ***Extremophiles***. 22, 811-823. 10.1007/s00792-018-1040-9.

[2]. Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Leboulanger, C., Ben Ouada, H., & Sayadi, S., **2018**. Effect of Bisphenol A on the extremophilic microalgal strain Picocystis sp (Chlorophyta) and its high BPA removal ability. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***. 158, 1-8. 10.1016/j.ecoenv. 2018.04.008.

[3]. Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Leboulanger, C., Zaghden, H., Choura, S., Ben Ouada, H., & Sayadi, S., **2018**. Effect and removal of bisphenol A by two extremophilic microalgal strains (Chlorophyta). Journal of Applied Phycology. 30, 1765-1776. 10.1007/s10811- 017-1386-x.

[4]. Bouallagui, Z., & Sayadi, S., **2018**. Bioconversion of p-Tyrosol into Hydroxytyrosol under Bench-Scale Fermentation. ***Biomed Research International***. Artn 7390751. 10.1155/2018/7390751.

[5]. Chebbi, A., Hentati, D., Cheffi, M., Bouabdallah, R., Choura, C., Sayadi, S., & Chamkha, M., **2018**. 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. ***Journal of Chemical Technology and Biotechnology***. 93, 1401-1412. 10.1002/jctb.5508.

[6]. Dahmen-Ben Moussa, I., Athmouni, K., Chtourou, H., Ayadi, H., Sayadi, S., & Dhouib, A., **2018**. Phycoremediation potential, physiological, and biochemical response of Amphora subtropica and Dunaliella sp to nickel pollution. ***Journal of Applied Phycology***. 30, 931-941. 10.1007/s10811-017-1315-z.

[7]. Fourati, R., Tedetti, M., Guigue, C., Goutx, M., Garcia, N., Zaghden, H., Sayadi, S., & Elleuch, B., **2018**. Sources and spatial distribution of dissolved aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface coastal waters of the Gulf of Gabes (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). ***Progress in Oceanography***. 163, 232-247. 10.1016/j.pocean.2017.02.001.

[8]. Fourati, R., Tedetti, M., Guigue, C., Goutx, M., Zaghden, H., Sayadi, S., & Elleuch, B., **2018**. Natural and anthropogenic particulate-bound aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters of the Gulf of Gabes (Tunisia, southern Mediterranean Sea). ***Environmental Science and Pollution Research.*** 25, 2476-2494. 10.1007/s11356- 017-0641-7.

[9]. Galiano, F., Friha, I., Deowan, S. A., Hoinkis, J., Ye, X. Y., Johnson, D., Mancuso, R., Hilal, N., Gabriele, B., Sayadi, S., & Figoli, A., **2018**. Novel low-fouling membranes from lab to pilot application in textile wastewater treatment. ***Journal of Colloid and Interface Science***. 515, 208-220. 10.1016/j.jcis.2018.01.009.

[10]. Hadrich, F., & Sayadi, S., **2018**. Apigetrin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells by downregulating PPAR gamma and CEBP-alpha. ***Lipids in Health and Disease***. 17. ARTN 95. 10.1186/s12944-018-0738-0.

[11]. Jebali, A., Acien, F. G., Barradas, E. R., Olguin, E. J., Sayadi, S., & Grima, E. M., **2018**. Pilot-scale outdoor production of Scenedesmus sp in raceways using flue gases and centrate from anaerobic digestion as the sole culture medium. ***Bioresource Technology***. 262, 1-8. 10.1016/j.biortech.2018.04.057.

[12]. Jebali, A., Acien, F. G., Sayadi, S., & Molina-Grima, E., **2018**. Utilization of centrate from urban wastewater plants for the production of Scenedesmus sp in a raceway- simulating reactor. ***Journal of Environmental Management***. 211, 112-124. 10.1016/j.jenvman.2018.01.043.

[13]. Jeddi, M., Karray, M., Loukil, M., Mhiri, N., Ben Abdallah M & Sayadi, S., **2018**.

Anaerobic biological treatment of industrial saline wastewater: Fixed bed Reactor performance and analysis of the microbial community structure and abundance. ***Environmental Technology.*** 7, 1-29. 10.1080/09593330.2018.1545802.

[14]. Jemli, M., Aloui, F., Karray, F., & Sayadi, S., **2018**. Organic pollutants biodegradation by halophile-isolated bacteria in saline conditions. ***Desalination and Water Treatment***. 113, 227-234. 10.5004/dwt.2018.22294.

[15]. Karray, F., Ben Abdallah, M., Kallel, N., Hamza, M., Fakhfakh, M., & Sayadi, S., **2018**. Extracellular hydrolytic enzymes produced by halophilic bacteria and archaea isolated from hypersaline lake. ***Molecular Biology Reports***. 45, 1297-1309. 10.1007/s11033-018- 4286-5

[16]. Kehili, M., Choura, S., Zammel, A., Allouche, N., & Sayadi, S., **2018**. 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. 10.1016/j.foodchem.2017.11.034.

[17]. Keskes, H., Belhadj, S., Jlail, L., El Feki, A., Sayadi, S., & Allouche, N., **2018**. LC-MS- MS and GC-MS analyses of biologically active extracts of Tunisian Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) Seeds. ***Journal of Food Measurement and Characterization***. 12, 209-220. 10.1007/s11694-017-9632-0.

[18]. Kouas, M., Torrijos, M., Schmitz, S., Sousbie, P., Sayadi, S., & Harmand, J., **2018**. Co-digestion of solid waste: Towards a simple model to predict methane production. ***Bioresource Technology***. 254, 40-49. 10.1016/j.biortech.2018.01.055.

[19]. Mahmoudi, A., Ghorbel, H., Feki, I., Bouallagui, Z., Guermazi, F., Ayadi, L., & Sayadi, S., **2018**. Oleuropein and hydroxytyrosol protect rats' pups against bisphenol A induced hypothyroidism. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***. 103, 1115-1126. 10.1016/j.biopha. 2018.03.004

[20]. Mahmoudi, A., Hadrich, F., Feki, I., Ghorbel, H., Bouallagui, Z., Marrekchi, R., Fourati, H., & Sayadi, S., **2018**. Oleuropein and hydroxytyrosol rich extracts from olive leaves attenuate liver injury and lipid metabolism disturbance in bisphenol A-treated rats. ***Food& Function***. 9, 3220-3234. 10.1039/c8fo00248g.

[21]. Mlaik, N., Khcharem, M., Kouas, M., Sayadi, S., & Khoufi, S., **2018**. Improvement of anaerobic biodegradability of organic fraction of municipal solid waste by mechanical and thermochemical pretreatments. ***International Journal of Environmental Science and Technology.*** 15, 1913-1920. 10.1007/s13762-017-1563-0.

[22]. Smaoui, Y., Mlaik, N., Bouzid, J., & Sayadi, S., **2018**. Improvement of Anaerobic Digestion of Landfill Leachate by Using Coagulation-Flocculation, Fenton's Oxidation and Air Stripping Pretreatments. ***Environmental Progress & Sustainable Energy***. 37, 1041-1049. 10.1002/ep.12781.

[23]. Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M., & Franzetti, A., **2018**. A non-toxic microbial surfactant from Marinobacter hydrocarbonoclasticus SdK644 for crude oil solubilization enhancement. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***. 154, 100-107. 10.1016/j.ecoenv.2018.02.032.

[24]. Zouch, H., Cabrol, L., Chifflet, S., Tedetti, M., Karray, F., Zaghden, H., Sayadi, S., & Quemeneur, M., **2018**. Effect of Acidic Industrial Effluent Release on Microbial Diversity and Trace Metal Dynamics During Resuspension of Coastal Sediment. ***Frontiers in Microbiology***. 9, Artn 3103. 10.3389/Fmicb.2018.03103.

- Chapitres d'ouvrages:

[**1**]. Fourati, R., Tedetti, M., Guigue, C., Goutx, M., Zaghden, H., Sayadi, S., & Elleuch, B., **2018**. Sources and Distributions of Dissolved and Particulate Hydrocarbons in Surface Coastal Waters from the Gulf of Gabes (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). ***Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions***, Vols I and Ii, 375-377. 10.1007/978-3-319-70548-4_119.

[**2**]. Kehili, M., Zammel, A., Zetzl, C., Smirnova, I., Allouche, N., & Sayadi, S., **2018**. Carotenoids-Rich Fatty Fractions Extraction from Tomato Industrial By-Products, Peels and Seeds, Using Supercritical CO2 Green Technology. ***Recent Advances in Environmental***

Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions, Vols I and Ii, 1183-1185. 10.1007/978-3-319-70548-4_343.

[**3**]. Kouas, M., Sousbie, P., Torrijos, M., Harmand, J., & Sayadi, S., **2018**. Codigestion: Toward a Simple Model to Predict Methane Production. ***Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions***, Vols I and Ii, 941-943. 10.1007/978-3-319-70548-4_273.

- Brevet national d'invention:

1) Dorra Hentati, Sami Sayadi et Mohamed Chamkha. Biosurfactants de *Bacillus stratosphericus* : Production, caractérisation et potentialités biotechnologiques. INNORPI N° 2018/0098.

Formation diplômante

- Liste des thèses de doctorat es-sciences soutenues:

1) **Mokhles Kouas:** Caractérisation cinétique de la biodégradation de substrats solides et application à l'optimisation et à la modélisation de la codigestion. Thèse de doctorat encotutelle, en Biologie (Faculté des Sciences de Gabes) et en Génie des Procédés (Université de Montpellier). Soutenue le 21/06/2018.

2) **Sabrine Ben Ouada:** Effets des contaminants émergents sur les microorganismes phototrophes dans les écosystèmes aquatiques et pouvoir de remédiation. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques et Biotechnologies, ISBM, Monastir. Soutenue le 18/07/2018.

3) **Asma Mahmoudi:** Étude des effets protecteurs des extraits des feuilles de l'olivier riches en oleuropéine et en hydroxytyrosol sur la toxicité induite par le bisphénol A chez le rat. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenue le 27/11/2018.

4) **Dorra Hentati:** Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Thèse de Doctorat en cotutelle, en Sciences Biologiques (Faculté des Sciences de Sfax) et en Biotechnologie et Microbiologie (Université de Montpellier). Soutenue le 17/12/2018.

- Liste des Mastères soutenus:

1) **Omayma Kahla:** Importance de la coculture «Diatomée benthique-bactéries» dans la biodégradation du benzo(*a*)pyrène et du fluoranthène. Mastère de recherche, Sciences de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte. Soutenu le 16/04/2018.

Séminaires, journées et ateliers scientifiques

13) Journées LMI COSYS-Med, Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranéens, Gammarth, 17-18/12/2018.

14) 2nd meeting du Projet BIOGASMENA, Demonstartion of dry fermentation and optimization of biogastechnology for rural communities in the MENA region, Sfax, 15/05/2018.

Conventions/contrats avec des partenaires socio-économiques

1) Convention relative à la réalisation des analyses physico-chimiques, y compris des métaux lourds, des échantillons d'eau et de sédiments de la zone de Taparura «Société d'Etudes et d'Aménagement des Côtes Nord de la ville de Sfax».

2) Convention d'assistance de la société SEDD: Analyses physico-chimiques et

microbiologiques.

3) Convention d'assistance de la société SOTULUB: Analyses et expertise des différents projets environnementaux de l'usine.
4) Convention CBS-Société Amal, signée le 26/03/2018: Développement et application d'un consortium microbien capable de la dégradation de la pollution en hydrocarbures dans le périmètre contaminé composé de la station d'épuration de l'ONAS-Sfax Sud jusqu'à la zone de sortie des eaux traitées de l'ONAS dans la mer.

Projets de coopération scientifique internationale

1) **Projet ERANETMED: PYRODIGEST:** ***2018-2021:*** Conversion of olive oil wastes through combined pyrolysis and anaerobic digestion: energy, value added product and eco-fertilizers production.
2) **Projet Tuniso-Euroméditerranéan:** ***2017-2020:*** **ERANETMED-BIOGASMENA**: Demonstartion of dry fermentation and optimization of biogastechnology for rural communities in the MENA region.
3) **Projet USAID:** ***2017-2020:*** Partnerships for Enhanced Engagement in Research (PEER): Evaluation of algal treatment options for olive millwastewater to produce energy and biofertilizer.
4) **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.
5) **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.
6) **Laboratoire Mixte International:** ***2014-2019*****: LMI COSY-MED**: Contaminants et écosystèmes marins sud méditerranéens.
7) **Projet bilatéral Tuniso-Marocain**: ***2017-2019:*** Procédé innovant pour le traitement des rejets de tannerie combinant des procédés biologiques et/ou physico-chimiques.
8) **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.

LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME)

مخبـرالبيوتكنولوجيا الجزيئيّة للكائنات معزولة النوّاة

Responsable : Pr. Ali GARGOURI

Email : faouzi.gargouri@cbs.rnrt.tn

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Raja Mokdad-Gargouri	Pr	CBS
Ali Gargouri	Pr	CBS
Wajdi Ayadi	MA	CBS
Hèla Trigui-Lahiani	MA	CBS
Houda Skouri	MA	CBS
Mohamed Guerfali	MA	CBS
Basma Hadj Kacem	MA	CBS
Ines Belhaj-BenRomdhane	MA	CBS
Ines Maalej-Achouri	MT	ISET Bizerte
Rim Ladhar	MA	ISSAT Gabes
Fatma Trifa	MA	ISBM
Aida Koubaa-Feki	IP	CBS
Lamia Djemal	TS	CBS
Adel Saidi	T	CBS
Naourez Damak-Boujelben	IC	Nabeul
Dorra Benayed-Guerfali	PDoc	CBS
Salma AbdelJalil-Trabelsi	PDoc	CBS
Rania Abdelmaksoud-Damak	PDoc	CBS
Emna Dabbèche-Bouricha	PDoc	CBS
Ysora Kamoun	PDoc	CBS
Ines Benhmad-Krid	PDoc	CBS
Ines Borgi	PDoc	CBS
Hajer Tounsi	PDoc	CBS
Hanen Mallek-Fakhfakh	PDoc	CBS
Azza HadjSassi	PDoc	CBS
Wafa Mihoubi	PDoc	CBS
Sihem BenAbid	PDoc	CBS
Awatef Taktak- Ben Amar	PDoc	CBS
Manel Boudabbous- Ben Amor	PDoc	CBS
Nihel Ammous-Boukhris	PDoc	CBS
Amena Saadallah- Kallel	PDoc	CBS
Emna Ketata	PDoc	CBS
Omaima Kamoun	D, FSS	CBS
Ines Ayedi	D, FSS	CBS
HèlaMkaouar	D, ENIS	CBS, cotutelle avec INRA Jouy en Josas
Aicha Kriaa	D, FSS	CBS, codirection INRA Jouy en Josas
NizarAkermi	D, FSS	CBS, codirection INRA Jouy en Josas
Amine Jablaoui	D, FSS	CBS, codirection INRA Jouy en Josas
Souha Soussou	D,ENIS	CBS, codirection INRA Jouy en Josas

OBJECTIFS GENERAUX

- Produire et Fournir des enzymes dégradatives et des molécules antimicrobiennes pour des applications industrielles diverses (Agroalimentaire, textile, biocomposites, papeterie, etc..)
- Produire de nouvelles sources de bioénergiessur la base de levures et champignons oléagnieux et valoriser les déchets agro-industriels…
- Fournir aux médecins et aux patients un service d'analyse moléculaire des gènes impliqués dans le cancer ainsi que d'autres tests moléculaires.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Production et études biochimiques et moléculaires des enzymes
- Isolement et études des potentialités biotechnologiques de levures et moisissures oléagineuses
- Exploitation de biomolécules de synthèse chimique ou biologique dans divers domaines d'application

- Expression hétérologue des protéines d'intérêt et leur utilisation comme cibles dans des expériences de phage display
- Etudes moléculaires (génétique et épigénétique) sur les gènes impliqués dans certains cancers et autres pathologies humaines.

LISTE DES PROJETS

1- Projet1 : Enzymes *dégradatives* fongiques et valorisation de la biomasse (*A. GARGOURI*)
2- Projet 2 : Potentialités fongiques en biotechnologie et bioénergies (*A. GARGOURI*)
3- Projet 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 : Enzymes dégradatives fongiques et valorisation de la biomasse (Responsable : A. GARGOURI)

I- Exploitation de la beta glucosidase de *F. solani* pour la biosynthèse de biomolécules d'intérêt biotechnologique

Dans le cadre de biosynthèse de biomolécules d'intérêt biotechnologique, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'alkyl-glucosides (AG) par la β-glucosidase (FBgl1) de *Fusaruimsolani*. Ces molécules sont des tensioactifs biodégradables, non ioniques, qui possèdent des propriétés détergentes, moussantes, mouillantes et émulsifiantes. Les alkyl-glucosides sont doués également d'activité antimicrobienne. Ces molécules sont souvent utilisées dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et détergentes.
La réaction de synthèse de butyl-glucosides menée par la FBgl1 en utilisant le butanol et le glucose, comme substrat, a donné trois molécules. Le mélange obtenu était capable de réduire la tension de surface de l'eau de 68 mN/m à 34,1 mN/m avec une concentration micellaire critique (CMC) de 1 g/l. L'activité antimicrobienne de ces molécules a été prouvée également sur des bactéries Gram positif et Gram négatif. En effet, ces molécules ont montré un effet antimicrobien contre *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella sp* et *Listeria sp* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) située entre [125,250], [250,500], [125, 250] et [2, 50] µg/ml, respectivement.
La réaction de synthèse de butyl glucosides réalisée en utilisant le butanol et le cellobioseadonné quatre molécules. De même, ce mélange était capable de réduire la tension de surface de l'eau de 68 mN/m à 37,1 mN/m et présente une CMC de 0.5 g/l. En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, ce mélange présente les mêmes valeurs de CMI que le mélange obtenu par la première réaction. La séparation et la détermination de la structure chimique de ces molécules sont en cours de réalisation.

II- Développement d'un système compatible cellulase-ion liquide pour la saccharification d'une biomasse lignocellulosique

Récemment, les ions liquides (ILs) sont utilisés comme des solvants « verts » pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique avant l'hydrolyse enzymatique en vue delaproduction de bioénergie. Les ILs sont des sels organiques qui présentent des caractéristiques physico-chimiques désirables comme un faible point de fusion, non volatile, une thermo stabilité élevée et non inflammable. Le problème, c'est que la majorité des cellulases

sont inactives en présence de ces nouvaux solvants. Pour cela, la saccharification enzymatique de la biomasse régénérée doit être effectuée en deux étapes séparées. Ainsi, l'élimination de l'IL après l'étape de prétraitement de la biomasse nécessite une très grande quantité d'eau et ceci demande de l'énergie qui augmente le coût du processus. Ainsi, les cellulases tolérantes aux IL sont très recherchées.

Dans ce travail, nous avons développé un système compatible cellulase-IL de la souche fongique *Stachybotrys microspora.*Rappelons que cette souche locale secrète des endoglucanases capables d'agir à pH neutre et basique, une qualité très rare dans le monde fongique et très recherchée dans les industries de la détergence et le délavage. De plus, cette souche s'est révélée être aussi halophile. Nous avons réussi à purifier deux endoglucanases halophiles EG1 et EG2. Il est à relever que l'halophilie de l'enzyme EG1 est très intéressante surtout qu'elle est unique dans le monde fongique. Notons qu'une souche halophile est normalement susceptible de produire des cellulases halophiles compatibles avec les ILs.

Dans un premier volet, nous avons étudié la tolérance au sel de la souche *S.microspora.* La comparaison de la capacité hydrolytique des souches N1 (sauvage), A19 (mutant) et Rut C30 (mutant de la souche cellulolytique commerciale *Trichoderma reesei*) en présence de différentes concentrations de NaCl montre que N1 et A19 possèdent la capacité hydrolytique la plus élevée en présence de sel avec un optimum à 5% NaCl. Nous avons choisi de travailler sur A19 puisque c'est un mutant légèrement plus producteur de cellulases. Afin de tester la résistance des cellulases d'A19 en présence des ILs, nous avons évalué le comportement de ces enzymes en présence de différents type d'ILsà différentes concentrations (5% - 10% - 15% - 20% - 25% - 30%). L'activité cellulase a été augmentée à 115,5% et 114,5% en présence de 5% (v/v) de 1-éthyl-3-méthylimidazolium diéthylphosphate ([Emim] [DEP]) et de 1-allyl-3-méthylimidazolium chlorure ([Amim] [Cl]) et elle est active avec 84,44% et 76,74% à 30% (v/v), respectivement. L'activité cellulase a été plus sensible au 1-éthyl-3-méthylimidazolium méthylsulfate ([Emim] [MtSO4]) avec une activité résiduelle de 72% et 25% à 5% et 30% d'IL, respectivement.

Dans un deuxième volet, nous avons testé l'efficacité des ILs pour le prétraitement du son de blé. Les résultats montrent la séquence suivante : ([Emim] [DEP]) > ([Amim][Cl]) > ([Emim] [$MtSO_4$]). L'optimisation de la concentration de ([Emim] [DEP]) pour la saccharification *in situ* montre que le rendement le plus élevé des sucres réducteurs est à 15% de ([Emim] [DEP]). En effet, la saccharification *in situ* du son de blé prétraité avec l'IL a été significativement améliorée par rapport à la biomasse non traitée (2,6 fois). Les résultats sont approuvés par analyse HPLC. Ainsi, un système efficace couplé à la solvatation et à l'activation de l'hydrolyse cellulasique d'une biomasse végétative dans un processus à un seul récipient, a été mis au point

III- Valorisation par voie enzymatique de coproduits de poisson en biomolécules à haute valeur ajoutée

Les huiles de poisson présentent la particularité d'être riches en acides gras oméga 3 et notamment en acides gras polyinsaturés à longues chaînes (AGPI-LC) comme l'acide éicosapentaénoïque (EPA ; C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6 n-3). Les implications de ces huiles marines au niveau de la nutrition et de la santé se sont révélées comme préventives contre les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose, des fonctions cognitives et dans le développement du système nerveux central.

Malgré les quantités considérables de coproduits de poisson riches en matière grasse générées par les industries de la pêche et de l'aquaculture, elles sont malheureusement très mal valorisées. En plus, les lipides sont généralement extraits par des méthodes chimiques basées sur leur solubilité dans les solvants organiques, permettant de les isoler des autres constituants non

lipidiques. Ces méthodes d'extraction puissantes sont aujourd'hui remises en cause, d'abord en raison des risques liés aux traces des solvants utilisés, ensuite à cause de l'image négative que ces substances affichent aujourd'hui.

Compte tenu de ces observations, nous avons investigué l'utilisation des coproduits de sardine (*Sardinella aurita)*, dans le but de les valoriser par une méthode biologique et les intégrer en alimentation animale et, dans une seconde étape, humaine. Pour ce faire, nous avons choisi un procédé d'hydrolyse enzymatique qui devrait permettre la valorisation conjointe des fractions protéiques et lipidiques de ces coproduits. Cette hydrolyse dans des conditions de température qualifiée de "douce" (inférieure à 60 °C), conduit à la fois à une bonne qualité alimentaire des produits et à la stabilité des huiles riches en acide gras polyinsaturés.

Les coproduits utilisés dans cette étude sont les têtes et viscères de *S. aurita* dont la composition physico-chimique est de 8,9 et 15 % de lipides et protéines respectivement. L'hydrolyse a été réalisée par une protéase commerciale, l'alcalase et par la protéase de notre souche P2, les deux à 50°C, pH8.

Le degré d'hydrolyse (DH) exprimé en pourcentage permet d'évaluer de façon globale l'action des enzymes sur le substrat et l'efficacité du procédé d'hydrolyse. Il est en effet le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques coupées lors de l'hydrolyse et le nombre de liaisons peptidiques totales du substrat. Il renseigne donc de manière indirecte sur la longueur des peptides résultants et donc sur leurs propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et sensorielles.

L'allure générale de ces cinétiques est classique et s'apparente à celles décrites dans la littérature notamment pour des produits et coproduits marins. Cependant, certains paramètres peuvent influer sur cette cinétique. Par exemple l'augmentation de la teneur en peptides solubles dans le milieu réactionnel, peptides qui sont susceptibles d'agir comme des inhibiteurs de la réaction de protéolyse.

Le degré d'hydrolyse est de 24,28% pour l'alcalase, alors qu'il peut atteindre aisément 41,34% pour P2. Après hydrolyse, nous avons vu que la quantité d'huile surnageant(3,93% pour l'alcalase et 3,85% pour P2) reste relativement modeste compte tenu de la richesse de *Sardinellaaurita*en huile (8,29%), ce qui correspond à un rendement de 47,41% et 46,44% pour l'alacalse et P2 respectivement. Ceci serait relié à la faiblesse du DH, le réseau protéique reste plus ou moins intact retenant une grande partie des lipides.

Les compositions en acides gras des lipides générées après hydrolyse des coproduits de sardine ont été établies. Quelle que soit l'enzyme utilisée pour l'hydrolyse (alcalase ou P2), l'huile de poisson obtenue présente le même profil des acides gras et presque les mêmes proportions, avec une richesse en ω3 et un excellent rapport ω3/ω6.

IV- Recherche de molécules inhibitrices de la tyrosinase et de la mélanogenèse

La tyrosinase catalyse l'étape clé de la synthèse de la mélanine. Dans ce travail nous avons entamé la recherche d'inhibiteurs de cette enzyme en vue de les utiliser comme moyen de prévention de la pigmentation que ce soit dans le domaine cosmétique ou dans le domaine agroalimentaire. Nous avons commencé par un criblage des inhibiteurs de la tyrosinase à partir d'un groupe de molécules chimiques nouvellement synthétisés, un groupe de dérivés des composés Ferrocenyl-Aryl-Buteneet un groupe de dérivés des composés Morita-Baylis-Hillman adducts, donnés par deux équipes avec qui nous collaborons.

Concernant le groupe des molécules Ferrocenyl-aryl-butene, nous avons trouvé 4 molécules inhibitrices de l'activité tyrosinase. L'étude de la cinétique de l'effet inhibiteur de la tyrosinase montre que 3 molécules sont inhibitrices de type compétitif et une autre non compétitif. La molécule ayant l'effet inhibiteur le plus puissant est la molécule 8 ou Ferrociphénolavec une valeur d'IC_{50} de l'ordre de 0.02 mM. En parallèle, une étude de prédiction moléculaire des

différentes interactions possibles entre les inhibiteurs et la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* montre que le groupement hydroxyle est indispensable pour l'inhibition de la tyrosinase et que le groupement ferrocényle y contribue significativement.
Puis nous avons étudié l'effet de Ferrociphénol sur la mélanogenèse par un test *ex vivo* en utilisant un modèle plus proche de l'homme: des cellules de mélanome de souris B16F10, et un test *in vivo* en utilisant des souris noires Black 57 et des embryons du poisson Zèbre. Nous avons trouvé que le composé 8 a fait diminuer la quantité de mélanine, l'activité tyrosinase et l'expression de la tyrosinase dans les cellules B16F10 traitées par l'IBMX à une concentration de 500 µM. Une étude spectro-photométrique a montré que la quantité de mélanine et l'activité tyrosinases extraites à partir des embryons du poisson Zèbre ont été légèrement diminuées à une concentration de Ferrociphénol de 50 µM. De plus, un test de la molécule sur des souris noires (Black 57) montre un effet inhibiteur de la mélanogenèse au niveau de l'épiderme, derme et racine du poiles dès la concentration 20 µM.
Pour le groupe des dérivés des composés Morita-Baylis-Hillmancyclic adducts, nous avons trouvé 3 molécules inhibitrices de l'activité tyrosinase de l'encre de seiche. L'analyse de la cinétique de l'inhibition enzymatique montre que la molécule 1a (2-hydroxymethyl) cyclohex-2-enone) et 5f (diethyl (1-(6-oxocyclohex-1-en-1-yl) ethyl) phosphonate)sont deux inhibiteurs compétitifs alors que le composé 3b (6-oxocyclohex-1-en-1-yl) ethylacetate) est non compétitif. Parmi ces molécules inhibitrices, nous avons trouvé que la molécule 1a est l'inhibiteur le plus puissant est sa valeur de Ki est de 4.7 mM.
Après avoir trouvé des inhibiteurs de la tyrosinase, nous sommes passé à l'étape suivante, c'est la recherche des inhibiteurs de la mélanogenèse au niveau des cellules cancéreuses de mélanome de murine B16F10 qui produisent de la tyrosinase et de la mélanine d'une façon importante après induction par l'IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthine). Le résultat de cette étude montre qu'en présence des molécules 1a, 3b et 5f, la quantité de la mélanine cellulaire diminue d'une façon importante à une concentration de 50µM, sachant que les concentrations testées sur cette lignée cellulaire sont non cytotoxiques. Ainsi, l'activité tyrosinase des cellules B16F10 traitées par la molécule 3b montre une diminution importante par rapport l'activité tyrosinase des cellules non traitées à une concentration de 10µM, les molécules 1a et 5f ont une certaine diminution de l'activité tyrosinase cellulaire.

Projet 2 : Potentialités fongiques en biotechnologie et bioénergies (Responsable : A. GARGOURI)

I- Optimisation de la production du peptide antifongique AcAFP chez *E.coli*.

Les peptides antifongiques suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leur potentiel énorme comme étant un nouveau composé biopharmaceutique pour les industries de la santé humaine et animale, ainsi que pour leur application en agriculture conventionnelle et biologique. Nous nous intéressons au peptide AcAFP secrété par *Aspergillus giganteus*.
Afin de développer des stratégies de surproduction du peptide AcAFP, le système hétérologue procaryotes : *E.coli* BL21 et Origami et le vecteur d'expression pET-21a (+) ont été adoptés pour exprimer les trois formes peptidiques de l'AcAFP, à savoir la forme pré-pro (284 pb), la forme large (172 pb) et la forme mature (154 pb). L'analyse comparative pour l'optimisation de la production des peptides recombinants a été conduite parallèlement pour six clones différents :
pET 21a(+) / acfp total His_6-tag/BL21 ; pET 21a(+) / acfp large His_6-tag/BL21 ; pET 21a(+) / acfp mature His_6-tag/BL21 ;
pET 21a(+) / acfp total His_6-tag/Origami ; pET 21a(+) / acfp large His_6-tag/Origami; pET 21a(+) / acfp mature His_6-tag/Origami.

Cette analyse a été faite en suivant la production des peptides recombinants dans différentes conditions de culture cellulaire. Les facteurs majeurs qui peuvent affecter l'étape de la croissance cellulaire choisis pour cette étude sont la composition du milieu de culture (milieu LB et 2YT) et la température de l'induction (25°C, 30°C et 37°C). L'induction de l'expression a été faite en présence de 0.5 mM d'IPTG pendant 16 heures et sous une agitation de 180°C. La condition optimale obtenue permettant d'avoir un peptide AcAFP recombinant actif est celle du clone exprimant l'AcAFP mature/His_6-tag dans la souche Origami mis en culture sur milieu LB sous une température d'induction de 30°C, en présence de 0,5 mM d'IPTG et sous une agitation de 180 rpm. En parallèle, 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, a été conduite dans la levure *P. pastoris* et en utilisant le vecteur pPICZαC avec promoteur fort inductible par le méthanol.

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

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la production des lipides et des pigments d'intérêt chez les champignons filamenteux oléagineux. Plusieurs approches sont adoptées pour améliorer la production de ces composés, soit en imposant des conditions opératoires qui favorisent le processus d'accumulation ou en modifiant, par mutagenèse dirigée, le potentiel de production des souches sélectionnées.

Dans un premier temps, une optimisation des 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 les deux souches pour la production de biodiesel a été étudiée sur différents substrats carbonés et azotés. Les substrats carbonés testés étaient aussi bien des substrats modèles que des déchets agro-industriels. Les déchets ont donné des résultats compétitifs avec le glucose.Le rapport C/N doit être très important afin d'avoir une bonne production de lipides. Les résultats montrent que ces lipides sont respectueux des normes standards pour la production de biodiesel..

Une deuxième partie du travail a été consacrée à l'étude de l'impact de l'inactivation du gène Gut2 codant pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (qui catalyse la conversion du G-3-P en DHAP) sur la production des lipides par la souche E4-2 de *F. verticillioides*. Pour atteindre cet objectif, ce gène a été inactivé chez la souche sauvage E4-2, en utilisant la méthode de « double joint PCR ». Ceci a permis d'isoler un transformant (ΔGut2-5) résistant à l'hygromycine et dont le gène Gut2 est inactivé et remplacé par le gène de résistance à l'hygromycine.

La souche Δ*gut2-5* ainsi obtenue est capable d'accumuler plus de lipides que la souche sauvage (3,8 et 3,17 g/l respectivement), dans des milieux contenant le glycérol brut comme source de carbone. Pour les cultures réalisées en présence de glucose, de glycérol commercial et de l'huile de friture, les résultats obtenus indiquent que l'inactivation de ce gènen'a pas d'effet significatif sur l'accumulation des lipides puisque les teneurs en lipides totaux demeurent inchangées entre mutant et sauvage.

Au cours des travaux effectués sur la production des lipides, nous avons constaté que la souche E4-2 est capable de produire différents pigments en modifiant les paramètres du milieu de culture. Les extraits colorés obtenus ont été séparés par une chromatographie sur couche mince. Les extraits intra et extracellulaires ainsi que les fractions obtenus ont été testés sur des cellules cancéreuses. Ces extraits présentent un effet cytotoxique vis-à-vis des lignées cellulaires testées.

L'observation microscopique des cellules HT29 après coloration à la phalloïdine montre une modification morphologique des cellules traitées qui deviennent plus ronde avant leur décollement. Les noyaux de ces cellules apparaissent cependant identiques à ceux des cellules

témoins. Le(s) principe(s) actif(s) présent(s) dans les produits testés ne sont donc pas responsables de la mort des cellules par apoptose.

III- Etude moléculaire et fonctionnelle d'un transporteur ABC fongique

Au cours de ce travail, nous avons abordé l'étude moléculaire et fonctionnelle d'un transporteur ABC de *Penicillium occitanis*.

Ce sujet a débuté par le clonage, l'analyse moléculaire et l'inactivation du gène Podr1 qui code pour un transporteur ABC de *P. occitanis*. Ce transporteur montre une grande homologie avec la sous famille des PDR avec la structure [NBD-TMD_6]$_2$ d'où son nom *Podr1*. Les transporteurs appartenant à cette sous-famille sont le plus souvent associés avec la résistance aux antifongiques. 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 Podr1. Deux mutants (ΔPodr1-21 et ΔPodr1-9) altérés dans le gène Podr1 ont été retenus afin d'étudier l'impact de la délétion de ce gène sur la sensibilité du champignon à certains agents toxiques.

Dans le but d'étudier la fonction de ce transporteur chez *P. occitanis*, une analyse phénotypique des mutants (ΔPodr1-21 et ΔPodr1-9) a été entamée et ce, en comparant leurs comportements vis-à-vis de certains agents toxiques à celui de la souche mère CL100. L'activité inhibitrice de plusieurs produits (Antifongiques, antibiotiques, Acides, sels, sucres, etc…) a été mesurée par divers tests à savoir : le test de diffusion sur agar, celui par spot ou encore le test par microdilution sur plaque. Tous les antifongiques testés présentent une activité antifongique dose dépendante vis-à-vis des cibles. Néanmoins, cette activité reste similaire entre mutants et sauvage pour la majorité des antifongiques testés.

L'effet inhibiteur de la croissance exercé par l'acide sorbique est similaire pour les trois souches. Cet effet augmente en fonction du pH. En effet, l'analyse du pouvoir inhibiteur de l'acide sorbique sur la croissance des trois souches fongiques montre que son effet est plus accentué à pH3 qu'à pH 4 et 6. L'effet de quelques agents de stress osmotique (NaCl, KCl et sorbitol) en plus du glucose et du saccharose a été également étudié. Le test par spot en présence de 1 M de NaCl ou de KCl montre que les deux mutants altérés dans le gène Podr1 sont plus sensibles à ces sels que la souche sauvage CL100. Tous les sucres testés n'ont pas d'effet sur la croissance des souches fongiques.

L'effet de certains antibiotiques ainsi que d'autres agents toxiques (Rubidium, Bromure d'éthidium et acide oléique) a été également étudié. Tous ces produits n'ont pas d'effet sur la croissance des trois souches fongiques même à la plus forte concentration utilisée.

Dans un autre volet de ce travail, une étude de l'effet de certains produits tels que le peroxyde d'hydrogène, le NaCl, le KCl, le cycloheximide et le G418 sur le niveau d'expression du gène Podr1 a été abordée. La quantité du transcrit du gène Podr1 dans les différentes conditions a été estimée par RT-PCR. L'analyse, par le logiciel ImageJ, des bandes correspondant aux amplifications réalisées moyennant les amorces spécifiques du gène Podr1 et celles du gène de référence a montré que le niveau du transcrit est pratiquement le même dans toutes les conditions étudiées (champignon traitée ou non). Les produits testés n'ont donc pas d'effet sur le niveau d'expression du gène Podr1.

IV- Production de xylanases et pectinases en grande quantité et traitement de fibres de palmier

Ce travail entre dans le cadre d'un projet global qui consiste à valoriser les fibres de palmier pour les utiliser comme renfort dans de nouveaux matériaux biocomposites, ceci est réalisé en

collaboration avec le laboratoire des systèmes électromécaniques (LASEM) de l'ENIS.Dans ce contexte nous avons envisagé la mise au point à l'échelle industrielle des prétraitements chimiques et surtout enzymatiques qu'on appliquera sur cette fibre pour qu'elle ait des propriétés mécaniques de renfort.L'objectif principal de ce travail est d'éliminer la lignine, l'hémicellulose et la pectine moyennant un traitement chimique léger par la soude suivi d'un traitement enzymatique tout en gardant la cellulose intacte. Le traitement de ces fibres commence par leurs autoclavage avec la soude, ce prétraitement permet d'éliminer la lignine et d'améliorer l'accessibilité des biocatalyseurs à la matière lignocellulosique.
Alors que le traitement enzymatique a été réalisé par les xylanases et les pectinases produites par deux souches locales hyperproductrices de ces deux enzymes AX4 et CT1 respectivement.Une production d'enzyme en grande quantité a été réalisée par le biais d'un fermenteur.Pour ce faire, nous avons commencé par le stockage d'une grande quantité de spores desdeux souches puis des fermentations de cette souche avec le son de blé et le glucose à 2% comme sources de carbone, en fermenteur de 20 L et en shaker en utilisant les erlenmeyers de 1 L. La méthodologie globale de traitement enzymatique des fibres de palmier était la suivante:Le traitement enzymatique des fibres de palmier dattier a suivi la méthodologie suivante :10 g de fibres + 75 U/g Xylanases + 2100 U/g pectinases>>Incubation à 50°C pendant 24 h, 120rpm>> Lavage plusieurs fois des fibres et séchage à 50°C pendant 48 h
Ceci a été répété plusieurs fois pour obtenir 560 g fibres traitées. Cette quantité est suffisante pour les analyses morphologiques, spectroscopiques et mécaniques réalisées par nos collègues Mécaniciens.

<u>Projet 3 :</u> Etudes et Expression hétérologue de gènes eucaryotes impliqués dans le cancer et les maladies génétiques (Responsable : R. GARGOURI)

I- Cancer du Nasopharynx

I-1 Etude de la Transition Epithélio-mésenchymateuse dans le NPC

Dans le cadre de notre exploration du processus de dédifférenciation de cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (EMT) dans les tumeurs NPC, nous avons proposé d'étudier l'expression de marqueurs EMT de type micro-ARN d'origine cellulaire (miR-200a, miR145, miR-22) ou virale (miR-BART-1,7 et 9). La finalité de ce travail vise principalement à définir la signification clinique de chaque micro-ARN testé au moment du diagnostic primaire et également après une la chimiothérapie d'induction basée sur les molécules de Docétaxel, Cisplatine et 5FU. Nos résultats préliminaires établis à partir d'un échantillon de 41 biopsies tumorale de NPC ont montré des niveaux d'expression variables d'un micro-ARN à un autre et également pour le même micro-ARN testé. Globalement, il s'agit d'une expression relativement plus importante des micro-ARNs oncogènes d'origine virale, et au contraire moins importante des micro-ARNs cellulaires, qualifiés comme suppresseur de tumeur. Notre étude de corrélation avec les paramètres cliniques TNM a montré une expression relativement plus importante des 3 micro-ARNs viraux chez les deux patients ayant une métastase à distance M1, en comparaison avec les cas M0. La significativité statistique est vérifiée seulement dans le cas de miR-BART9 (R=38.01, p=0.0381). De même, notre analyse a montré une expression significativement plus faible du miR-200a chez les patients ayant une taille tumorale plus importante T3-T4 vs T1-T2 (ratio de *r=0.314 ; p=0,0184*). Nos données de corrélation sont en accord avec celles établies in vitro dans les cellules tumorales de NPC qui suggèreraient l'effet de la répression du miR-200a sur la prolifération tumorale accrue et également l'effet de la surexpression des micro-ARN-BARTs sur l'acquisition et le développement des propriétés relatives à la migration et l'invasion tumorale. Par ailleurs, notre analyse de corrélation avec l'âge a montré que l'expression du

miR-22 est significativement plus importante chez les malades de moins de 30 ans qui représentent la forme juvénile du NPC nord-africain, en comparaison avec la forme adulte (Ratio de 4.25 p=0,0176). Cette expression différentielle de miR-22 en fonction de l'âge est en accord avec nos données antérieures suggérant un mécanisme oncogénique distinct entre les deux formes du NPC nord-africain. Ces données ont été essentiellement rapportées par les études immuno-histochimiques de deux protéines clés du contrôle apoptotique p53 et Bcl2 et par les études sérologiques anti-EBV. En perspective, nous projetons de comparer les niveaux d'expression de chaque micro-ARN chez les malades avant tout traitement et après une chimiothérapie d'induction. L'interprétation du profil d'expression des micro-ARNs en fonction de la réponse des malades à la chimiothérapie d'induction permettrait finalement de proposer des marqueurs de pronostiques et/ou également prédictifs de réponse aux traitements qui pourraient donner de nouvelles réflexions sur la prise en charge thérapeutique des malades NPC, tenant compte de l'EMT.

I-2. Synthèse peptidique des régions clé de l'oncoprotéine de l'EBV : la LMP1et Sélection de peptides antagonistes par la technique du Phage Display

La protéine LMP1 est l'oncoprotéine majeure du virus de l'Epstein Barr. Elle agit par l'activation constitutive de différentes voies de signalisation cellulaires à citer la voie du NFkB et contribue alors à l'immortalisation des cellules B, l'inhibition de l'apoptose, l'inhibition de l'adhésion cellulaire, l'augmentation de l'invasion cellulaire, l'inhibition des cyclines kinase dépendantes,…

Sur le plan structural, la LMP1 est une protéine membranaire de 63 kDa comprenant une petite partie N-terminale intracellulaire, suivie par six domaines transmembranaires faisant apparaitre trois boucles extracellulaires et une longue partie C-terminale cytoplasmique très importante pour l'activité de cette protéine. Cette région C-terminale est subdivisée en trois domaines d'activation majeurs nommés CTAR1, CTAR2 et CTAR3 qui par le recrutement de protéines cellulaires comme les TRAFs (TNF Receptor Associated Factor) 1, 2, 3 et 5 et TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain) interagissent dans différentes voies cellulaires.

Plusieurs approches visant à moduler voire réprimer la LMP1 dans les cellules tumorales ont été entreprises. Nous avons opté pour la recherche de peptides antagonistes à cette protéine par la technique du phage display. Pour ce faire, nous avons synthétisé différents peptides représentant les domaines fonctionnels et importants de la LMP1 puis nous avons utilisé ces peptides comme cible pour cribler une banque peptidique par la technique du phage display. Nous avons identifié un peptide qui interagit avec la première boucle extracellulaire de LMP1 : B1. Ce peptide appelé B1.12 a été synthétisé et testé pour son affinité vis-à-vis de LMP1 par Molecular Docking, ainsi que par RMN et ITC. Par la suite, des tests fonctionnels ont été effectués sur des lignées cellulaires exprimant la LMP1 pour étudier son effet sur l'oncoprotéine et les différentes voies cellulaires qu'elle contrôle. Nous avons pu démontrer que B1.12 a diminué la viabilité cellulaire et a induit un arrêt du cycle cellulaire dans le point G0 / G1. En outre, l'expression de A20, pAkt et pNFkb (cibles de LMP1) dans les cellules LMP1+ traitées avec le peptide B1.12 a diminué par rapport aux cellules non traitées.

En conclusion, nous avons sélectionné un nouveau peptide capable de se lier spécifiquement à la boucle extracellulaire de LMP1 et qui est capable de moduler ses propriétés oncogènes.

II- Cancer du sein

II-1. Etude Moléculaire par séquençage nouvelle génération (NGS) des gènes responsables du cancer de sein héréditaire au Sud Tunisien

Le cancer du sein représente le premier cancer de la femme. 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 de 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. La présentation des familles de cancer du sein montre clairement que malgré leur forte pénétrance, les mutations délétères dans les gènes majeurs BRCA1 et BRCA2 ne conduisent pas toujours au cancer du sein. Cette pénétrance incomplète s'expliquerait par des facteurs environnementaux et génétiques modulant l'expression des mutations dans les gènes majeurs.

Nous avons analysé par NGS sur Miseq (Illumina) pour tous les exons BRCA1/BRCA2, 38 cas index appartenant à des familles non apparentées. Nous avons montré que 9 patientes (23.6%) portent des mutations délétères germinales, 6 sont localisées dans le gène BRCA2 et 3 dans le gène BRCA. Parmi ces mutations 3 sont retrouvées plus qu'une fois et toutes les mutations sont des délétions générant une protéine tronquée. Par ailleurs, nous avons corrélé les paramètres clinicopathologiques des patientes avec le statut mutationnel BRCA1/BRCA2 ; notre analyse a montré que une association significative avec le grade SBR (p=0.022). De plus toutes les patientes Triple Négatives (ER-/PR-/Her2-) sont porteuses d'une mutation dans BRCA1 alors que les patientes positives pour BRCA1 ont des tumeurs de type Luminal.

Outre le spectre mutationnel BRCA1/BRCA2 associé au cancer sein/ovaire héréditaire, nous avons comme objectif d'apporter un conseil génétique aux membres sains des familles chez qui le cas index est positif pour une mutation BRCA constitutionnelle délétère. Nous avons alors analysé par séquençage Sanger, 32 individus appartenant à 8 familles parmi 9 porteuses de mutation BRCA. La figure 2 montre que 14 individus appartenant à 7 familles sont positives pour la mutation trouvée chez la patiente de la famille en question.

II-2. Etude de l'expression du facteur de transcription FOXA1 dans le cancer du sein

Le facteur de transcription FOXA1 joue un rôle clé dans le développement et la progression tumorale. Nous avons analysé l'expression de FOXA1 dans 52 tumeurs du sein et 10 tissus normaux et examiner la relation entre FOXA1 et deux marqueurs EMT, à savoir Twist1 et E-cadhérine, respectivement par RT-PCR et IHC. Le niveau d'expression de FOXA1 était plus élevé dans la tumeur que dans les tissus normaux, mais la différence n'était pas statistiquement significative (p = 0,138). L'expression de FOXA1 était corrélée à un comportement moins agressif comme le SBR de grade I (p = 0,04), une tumeur de petite taille (p = 0,05) et une durée de survie plus longue (p = 0,001). De plus, les tumeurs positives aux oestrogènes et à la progestérone présentent un taux élevé de FOXA1 (p = 0,002 et p = 0,038 respectivement). L'analyse de survie a montré que les patients présentant une tumeur ER +/ FOXA1 + ou PR + / FOXA1+ ou HER-2 - / FOXA1+ présentent une survie globale prolongée. D'autre part, l'expression de l' E-cadhérine était positivement corrélée à FOXA1 (P = 0,028), alors qu'une association négative était observée entre l'expression de Twist1 et de FOXA1 (P = 0,016). L'analyse multivariée a montré que FOXA1 est un facteur indépendant de la survie du patient. Nos résultats indiquent que FOXA1 pourrait être un biomarqueur utile pour prédire le pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

III- Cancer colorectal

III-1 Etude du miR142-3p dans les tumeurs colorectales

Les micro-ARN (miARN) sont impliqués dans les tumeurs malignes humaines en régulant l'expression de plusieurs gènes clés. Les miARN contribue à la carcinogenèse colorectale par une régulation directe de leurs ARNm cibles en tant qu'oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, mais le rôle de miR-143-3p reste controverser. Le but de notre étude est d'analyser le niveau d'expression de miR-142-3p dans les tissus tumoraux par rapport à la muqueuse intestinale normale et de corréler l'expression de miR-142-3p avec des caractéristiques pathologiques cliniques. De plus, l'interconnexion de miR-142-3p et de la voie de la β-caténine Wnt, en particulier sur l'expression de 3 membres majeurs de cette voie: la β-caténine, l'APC et la E-cadhérine a été étudiée. Nous avons montré que miR-142-3p est surexprimé dans les échantillons de tumeurs par rapport à la muqueuse normale adjacente ($p = 0,011$). Le niveau d'expression de miR-142-3p associé à pT ($p = 0,0136$), à l'invasion vasculaire ($p = 0,029$) et au site tumoral ($p = 0,042$). En ce qui concerne la survie, le niveau d'expression élevé de miR-142-3p était en corrélation avec une survie plus courte ($p = 0,032$). L'analyse des cibles en aval a montré que l'expression de miR-142-3p était associée positivement à la β-caténine nucléaire et au CRC ($p = 0,037$). Nos données suggèrent que la régulation à la hausse aberrante de miR-142-3p est un candidat potentiel permettant de prédire un comportement agressif et un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR. Cet effet de miR-143-3p résulte au moins en partie de l'accumulation nucléaire de β-caténine, mais des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le dialogue entre miR142-3p et la voie de signalisation Wnt.

IV- Analyse Moléculaire de Marqueurs décisionnels pour la Thérapie

Dans le cadre d'un contrat MobiPost-doc, nous avons mis au point des tests moléculaires permettant de détecter, à moindre coûts, des mutations ou remaniements de plusieurs marqueurs théranostiques:EGFR / ALK: CBNPC ; RAS / MSI: CRC ; BRAF: Mélanome / CRC ; N-MYC: Neuroblastome. Ces kits « maison » seront validés en utilisant les kits de diagnostic moléculaire IVD commercialisés (Therascreen , Qiagen) , afin de pouvoir les utiliser en routine clinique. Nous avons collecté et extrait l'ADN de 8 échantillons de cancer colorectal (CRC), 11 échantillons de cancer du poumon (CBNPC) et 1 échantillon de mélanome cutané.

-Une analyse du statut mutationnel de l'EGFR par le kit "Therascreen® EGFR Pyro® Kit" pour la recherche des mutations au niveau des exons 18, 19, 20 et 21 du gène EGFR dans le CBNPC. Nous n'avons identifié aucune mutation au niveau de ce gène pour les patients analysés.

- Une analyse génétique des oncogènes RAS par les kits "Therascreen KRAS Pyro® Kit" et "RAS extension Pyro® Kit" pour l'identification des mutations au niveau des gènes KRAS et NRAS (codons 12, 13, 59, 61, 117 et 146) dans le CRC. Nous avons identifié plusieurs mutations au niveau des codons 12, 13 du gène KRAS.

- Une recherche des mutations au niveau des codons 464, 466, 469 et 600 de BRAF dans le CRC et le mélanome par le kit "Therascreen® BRAF Pyro® Kit". Les deux échantillons testés étaient sauvages.

V- Molécules à potentialités thrombotique et anti-thrombotique :

Les antiagrégants plaquettaires sont des molécules largement utilisés pour prévenir les événements thrombotiques chez les patients ayant des antécédents d'accidents cardiovasculaires. Malgré la diversité des médicaments commercialisés tant en nature de la molécule qu'en mode d'action, plusieurs effets secondaires sont liés à ces traitements.

Ce projet vise l'identification de molécules à potentialités thrombotiques et anti-thrombotiques. Les travaux ont été déjà initiés dans notre laboratoire, en collaboration avec la faculté de

médecine de Sfax et l'institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires de Toulouse-France. Nous avons criblé, grâce à un agrégomètre photométrique 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 pour laquelle nous avons décortiqué son mode d'action et les voies de signalisation impliquées.

Récemment, nous avons mis au point une nouvelle méthode d'agrégométrie sur microplaque permettant un criblage rapide de molécules anti-agrégantes puisqu'elle permet de tester un grand nombre d'échantillons en même temps ; en plus, cette méthode nécessite moins de volume en PRP et en agonistes. Après l'optimisation des conditions opératoires, nous avons testé le pouvoir antiagrégant d'une vingtaine de molécules chimiques synthétisés par Dr. Haitham Elleuch. Nous avons identifié une dizaine capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP. Nous avons déterminé la concentration optimale de chacune d'entre elles et nous avons vérifié que la plupart de nos molécules d'intérêt agissent de façon immédiate à l'exception de deux molécules nécessitant 15 min et 30 min d'incubation pour inhiber l'agrégation plaquettaire de manière efficace.

Des études de cytotoxicité de ces molécules s'imposent vu l'application thérapeutique envisagée. L'effet sur la viabilité plaquettaire a été évalué en mesurant l'activité de l'acide phosphatase intra plaquettaire. Nous avons montré que ces molécules ne sont pas toxiques pour les plaquettes surtout à leurs concentrations optimales.

La cytotoxicité sur la lignée HeLa, réalisée par le test MTT, a montré que certaine de nos molécules sont cytotoxiques alors que d'autres n'affectent pas la prolifération cellulaire à la concentration donnant l'effet antiagrégant souhaité.

VI- Isolement de peptides modulant l'effet apoptotique de la protéine suppresseur de tumeur P53

La technique de base pour le screening était le Phage Display qui a permis le criblage de banques de phages avec peptides aléatoires, ciblant soit la protéine p53 entière ou encore deux peptides synthétiques couvrant deux régions situées dans le N-terminal et le domaine central de la protéine. Une trentaine de séquences peptidiques sont ressorties de tous ces criblages. La suite était surtout un travail in silico : alignements, comparaison avec les banques de données des protéines et lecture des résultats ainsi que des études de docking moléculaire. Des tests *in vitro* ainsi que quelques expériences *in vivo* ont été entrepris pour le plus fréquent des peptides isolés. Ils ont montré que le peptide (dérivé du phage positif isolé) reconnait la partie C-terminale dela p53. Les deux voies doivent être améliorées et approfondies et aussi généralisées pour le reste des séquences obtenues. Un article scientifique descriptif (Ben Abid et al, 2019) est en soumission. Il porte sur le résultat global de cette étude de screening via phage display et présente les différents motifs peptidiques isolés.

VII- Effet du dosage génique de l'expression du gène *p53* sur la mort des cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae*

Dans les travaux antérieurs de notre équipe, nous avons montré que la surexpression du suppresseur tumoral humain *p53*, induit la mort des cellules de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par apoptose. Récemment, une autre équipe a montré, que l'expression de la P53 chez les cellules de levure *S. cerevisiae* induit la mort par autophagy. L'analyse détaillée de cette publication a révélé que le vecteur qu'ils ont utilisé est différent du nôtre de point de vue type de réplication et nombre de copies : le nôtre est multimérique à base du 2mu et le leur est centromérique donc en monocopies.

Afin de mieux comprendre la mort cellulaire induite dans le système d'expression levure via l'expression du gène *p53*, nous avons décidé d'étudier l'impact du dosage génique sur la mort cellulaire induite chez les cellules de levure.

Nous avons mené une étude comparative dans deux systèmes d'expression en se basant sur la variation de l'expression du nombre de copie du gène *p53*.La première construction porte un plasmide multicopies avec une origine de réplication 2 microns (2µ) qui assure l'expression de plusieurs copies du gène *p53* dans une cellule et un marqueur de sélection 'Uracile'.La deuxième construction porte un plasmide monocopie centromèrique et un marqueur de sélection 'Tryptophane' ; Sachant que chez les deux souches, le gène *p53* dans chaque construction est en aval d'un promoteur inductible par le galactose (Gal10).

Ainsi, après avoir transformé chaque construction dans la souche de levure, nous avons comparé les cinétiques de croissance des deux souches (transformées chacune par une seule construction) sur milieu minimum galactose solide (sans uracile pour la première construction et sans tryptophane pour la deuxième construction).

Nous avons trouvé que la souche transformée par la deuxième construction où le gène *p53* est exprimé en une seule copie, présente une mortalité cellulaire 3 fois moins que la souche transformée par lapremière construction où le gène *p53* est surexprimé en multicopies. De plus, nous avons quantifié par Q-PCR le nombre de copie du gène *p53* dans les 2 souches et nous avons révélé que le taux important de mortalité observé chez les cellules de la première souche *S. cerevisiae* est dû à la présence d'un nombre de copie du gène *p53* de l'ordre de 10 à 20 fois. Le plus important est que le test d'apoptose à l'annexin V était positif pour le clone multicopies et négatif pour le centromérique. L'inverse était vrai pour le test révélant le marqueur de l'autophagie, en l'occurrence le profile sur western blot du marqueur atg8, qui a confirmé l'autophagie dans le centromérique et son absence dans l'autre clone et le témoin. Ces résultats confirment que la mort cellulaire des cellules de *S. cerevisiae* dépend du dosage génique de l'expression du gène p53.

Production scientifique et diplômante

I/ Liste des publications parues en 2018:

1. Amin Jablaoui et al :Biotechnological Applications of Serine Proteases: A Patent Review.***Recent Patents on Biotechnology***. 2018 Dec ;12(4).
2. Haitham Elleuch et al :Potential antioxidant activity of Morita-Baylis-Hillman adducts. ***Bioorganic Chemistry.***2018 August ;78:24-28.
3. Didac Carmona-Gutierrez et al : Guidelines and recommendations on yeastcelldeath nomenclature. *MicrobialCell.*2018 Jan 1; 5(1): 4–31.
4. Nizar Akermi et al :Relevant Patented Biotechnological Applications of Ecotin: An Update. ***Recent Patents on Biotechnology***.2018;12(4):233-238.
5. Ines Ayedi et al : Screening of new oleaginous yeasts for single celloil production, hydrolytic potential exploitation and agro-industrial by-products valorization. ***Process Safety and Environmental Protection***.2018 October;119:104-114.
6. Omama Kamoun et al : *Fusarium verticillioides* as a single-celloil source for biodiesel production and dietarysupplements.***Process Safety and Environmental Protection***.2018 August ;118:68-78.
7. Ines Ben Hmad et al :Two Distinct Hydrolysis Mechanisms of the Neutral Endoglucanases EG1 and EG2 of *Stachybotrys microspora*. ***Catalysis Letters*** . 2018 May;148:2190–2199.
8. Saoussen Debouki-Joudi et al :Overexpression of the Oncogenic Variant (KLF6-SV1) in Young NPC Patients and CorrelationwithLack of E-Cadherin.***Analytical Cellular Pathology.***2018 April. Volume 2018, Article ID 9654067, 7 pages.

9. Inès Belhaj et al : Galactolipase activity of *Talaromyces thermophilus* lipase on galactolipid micelles, monomolecular films and UV-absorbing surface-coated substrate. ***(BBA) - Molecular and CellBiology of Lipids***. 2018 Sep;1863(9):1006-1015.
10. Maryem Bezine et al :The effect of oxysterols on nerve impulses. ***Biochimie***.2018 October;153:46-51.
11. Thomas Nury et al : Induction of peroxisomal changes in oligo dendrocytes treated with 7-ketocholesterol: Attenuation by α-tocopherol. ***Biochimie***.2018 October;153:181-202.
12. Imen Lahmar et al :Valorization of a plant β-amylase: Immobilization and dataset on the kineticprocess.***Data in Brief.*** 2018 February;16:386-391.
13. Imen Lahmar et al :Immobilization and topochemical mechanism of a new β-amylase extracted from *Pergularia tomentosa*.***Process Biochemistry***.2018 January;64:143-151.
14. Ahlem Chakchouk-Mtibaa et al :Safety Aspect of *Enterococcus faecium* FL31 Strain and Antibacterial Mechanism of Its Hydroxylated Bacteriocin BacFL31 against *Listeria monocytogenes*. ***BioMed Research International***.2018 November Volume 2018, Article ID 5308464, 10 pages.

II/ Liste des brevets d'invention (INNORPI, PCT et autres) déposés en 2018

Omama Kamoun et al : Production de lipides d'intérêt par une nouvelle souche de *Fusariumverticillioides* et leur explication pour la synthèse de biodiesel.***(Déposé à l'INNORPI sous le N° TN 2018/0141 en date du 26Avril 2018).***

III/ Liste des thèses soutenues en 2018

Emna Ketata : Recherche de composés inhibiteurs de l'activité tyrosinase et de la mélanogenèse.***Soutenue le 12 Mars 2018***.(Faculté Des Sciences De Sfax).(Encadreur : Ali Gargouri).

LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB)

مخبر المبيدات البيولوجية

Responsable : Pr.slim TOUNSI

Email : slim.tounsi@cbs.rnrt.tn

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	Grade	Nom et Prénom Etudiants	Grade
Tounsi Slim	Professeur, Directeur du laboratoire	Zouari Imen	Post-Doc
Rouis Souad	Professeur	Dalel Ben Farhat	Post-Doc
Kais Jamoussi	Professeur	Maissa Chakroun	Post-Doc
Hichem Azzouz	Maître de Conférences	Jihen Mseddi	Doctorant
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	Maissa TRIKI	Doctorant
Saoussen Ben Khedr	Post-Doc		
Fatma Masmoudi	Post-Doc		

OJECTIF GENERAL

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

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.

LISTE DES PROJETS

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) :

1. **Projet 1 :** Etude et Production de bioinsecticides d'origine microbienne et végétale (*Pr S. TOUNSI)*
2. **Projet 2 :** Etude et production de biofongicides d'origines microbienne et végétale (*Dr K. JAMOUSSI)*
3. **Projet 3 :** Etude et production de Bactéricides d'origines microbienne et végétale (*Dr O. FRIKHA et Pr S. TOUNSI)*

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS :

Projet 1: Etude et production de bioinsecticides d'origines microbienne et végétale (Responsable : Pr S. TOUNSI)

1-Bioinsecticides actifs contre les diptères : Investigation des delta-endotoxines de la souche BUPM55 de *Bacillus thuringiensis* active contre les moustiques

Les bioinsecticides à base de la bactérie *B. thuringiensis* sont de plus en plus utilisés comme substituant écologique des insecticides chimiques dans le contrôle des ravageurs de cultures et vecteurs de maladies. BUPM55 est une nouvelle souche de *B. thringiensis* à activité insecticide contre le diptère *Aedes aegypti*

Dans le contexte de la recherche de nouvelles toxines montrant des activités insecticides intéressantes, nous avons étudié l'expression du gène *cry30Er* cloné à partir de la souche BUPM55. L'alignement de la séquence protéique codée par *cry30Er* avec celle de Cry30Ea publiée montre l'originalité de la delta-endotoxine Cry30Er. En effet, elle présente quatre substitutions dont deux sont localisées dans des régions clés pour son activité larvicide. Le gène *cry30Er* a été cloné dans le vecteur : pBAD-GFPuv. L'expression hétérologue de la protéine Cry30Er est réalisée chez *E. coli* sous le contrôle du promoteur fort PBAD inductible à l'arabinose. L'analyse par SDS-PAGE des protéiques de la souche d'*E. coli* renfermant le plasmide pBAD-*cry30Er*, sous différentes conditions d'induction, a montré l'absence d'une bande de 78 kDa. La non expression du gène *cry30Er* pourrait être due à sa nature (un pseudogène) comme il a été déduit dans des travaux antérieurs ou à cause de l'instabilité de son ARNm et/ou à d'autres facteurs post traductionnels. Dans ce contexte une étude *in silico* est en cours.

Par ailleurs, nous avons étudié l'expression de nouveaux gènes de type *cry30G*, *cry50B* et *cry54B* codant de nouvelles delta-endotoxines de la souche BUPM55. Nous avons réussi

l'expression des protéines Cry30Gr, Cry50Br et Cry54Br. Les résultats obtenus montrent que les protéines Cry30Gr et Cry54Br (protoxines et toxines actives) sont instables après 2h de solubilisation. L'optimisation de l'expression de ces protéines est en cours.

En conclusion, l'étude de l'expression de ces nouveaux gènes *cry* de manière individuelle, nous permet de les caractériser de point de vue structure-fonction, mode d'action, récepteurs spécifiques, spectre d'activité, cristallisation et synergie d'action.

2-Bioinsecticides actifs contre les lépidoptères

2-1- Investigation des nouvelles toxines de *Bacillus thuringiensis* de type Cry1E

Un criblage par PCR a été fait sur 120 isolats de *Bt* dans le but de sélectionner des souches produisant les toxines de type Cry1E. Un isolat, nommée BUPM14, a été sélectionné pour la suite du travail. Son profil plasmidique a été établi et comparé à ceux de souches de référence de différentes sous-espèces. Une forte ressemblance a été détectée avec BNS3 subsp. *kurstaki*.

Le gène *cry1E* issu de la souche BUPM14 a été amplifié par PCR et a été cloné dans le vecteur pGEM. La comparaison de la séquence nucléotidique obtenue avec celles déposées dans la banque de données NCBI a révélé certaines différences qui pourront dégager des différences au niveau de la structure en acides aminés.

Dans le but d'exprimer le gène *cry1E* issu de BUPM14 chez *Escherichia coli*, un clonage dirigé dans le vecteur d'expression pBAD a été effectué. L'expression a été étudiée pour certains clones par SDS-PAGE. L'analyse des résultats a démontré une faible expression de la toxine Cry1E dans le vecteur utilisé même suite à des essais d'optimisation des conditions d'expression. Un autre vecteur a été donc choisi pour l'expression : c'est le vecteur pET. Le clonage a été fait avec succès et l'étude de l'expression est en cours.

2-2- Investigation des nouvelles toxines de *Bt* de type Cry1D

Suite à l'étude moléculaire du gène *cry1D-250* préalablement établi au laboratoire, une étude structurale de la toxine Cry1D-250 correspondante a été menée dans le but d'expliquer l'origine de la haute toxicité de la souche BLB250 productrice de la dite toxine contre l'insecte *Spodoptera littoralis* : Dans un travail antérieur, nous avons démontré que la présence d'un résidu de lysine à la position 381dans la structure de Cry1D-133 est à l'origine de sa plus forte activité par rapport à Cry1Da1. Cependant, comme toutes les autres Cry1D connus, Cry1D-250 possède un résidu glutamate à la même position. Sachant que Cry1D-250 est plus active que Cry1D-133 et Cry1Da1, nous avons conclu que l'effet de G224 et I561 sur la toxicité de Cry1D est plus prononcé que l'effet de K381. Par conséquent, une attention particulière a été accordée à l'effet de G224 et I561 sur l'amélioration de la toxicité de Cry1D-250. **i)** La présence de Gly à la position 224, plutôt que Asp comme dans les autres toxines Cry1D, stabiliserait l'environnement hydrophobe des résidus aromatiques conservés W225 et Y228, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la toxicité de Cry1D-250 par rapport aux autres protéines Cry1D apparentées. Ces deux résidus appartiennent aux quatre résidus hydrophobes conservés dans l'hélice 7 dont l'occurrence et l'hydrophobicité jouent un rôle crucial dans la toxicité des protéines Cry. **ii)** Le résidu I561, situé dans une boucle du domaine III de Cry1D-250, est capable d'interagir avec le résidu Y513 appartenant au bloc conservé 4 ou à la région «Arg face». Le résidu Y513 dans les protéines CrylD est l'équivalent de la deuxième arginine de la région « Arg face » de Cry1Aa, qui est très importante pour la stabilité structurelle de la toxine. Dans toutes les autres toxines Cry1D, l'équivalent de 1561 est un résidu de Phe qui établit une interaction avec Y513 dans la région « Arg face » de manière similaire à celle de 1561. D'où, l'implication de ces deux résidus dans la forte toxicité de Cry1D-250.

2-3-Valorisation des biopesticides à base de *B. thuringiensis*, du laboratoire vers le marché.

Les souches BLB1 et LIP de Bt ont été identifiées et caractérisées simultanément par le laboratoire des Biopesticides au CBS et à l'USJ Liban respectivement. Ces deux Souches ont montré un rendement plus important de toxines et une plus forte toxicité contre des larves de lépidoptères modèles, par rapport à la souche commerciale HD1. Dans le cadre du projet européen IPM-4-CITRUS, une initiative de valorisation de biopesticides à base de ces souches a été entreprise. L'objectif était de développer deux nouveaux biopesticides actifs contre les parasites des agrumes et d'assurer leur maturité technologique vers le marché (figure 1).

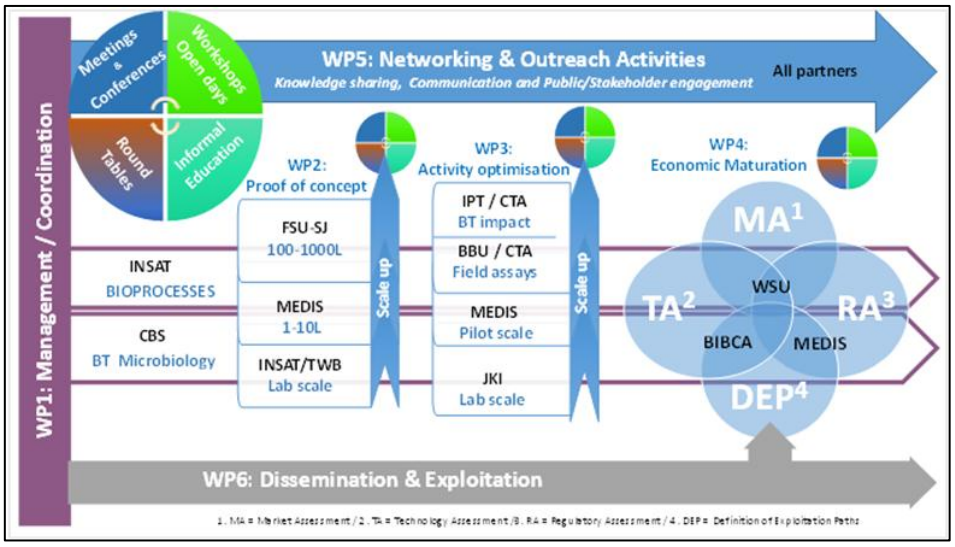


Figure 1: Structuration des étapes de maturité technologique du laboratoire vers le marché

Les activités de recherche et d'innovation de cette initiative reposent sur une approche multidisciplinaire, qui vise à sensibiliser les parties prenantes aux facteurs de risque pour la santé liés aux parasites des agrumes et à développer une approche alternative de lutte intégrée contre les ravageurs basée sur la lutte biologique. Parallèlement à la validation par des tests sur le terrain, l'initiative ouvrira la voie à la future exploitation commerciale de ces nouveaux biopesticides en élaborant une étude de faisabilité pour de futures activités dérivées et / ou de nouvelles lignes de production dans les PME partenaires. Les travaux réalisés dans le cadre du premier paquet d'activités « Preuve de concept » ont permis d'atteindre les objectifs suivants: une étude bibliographique permettant de résumer l'état de l'art relatif à la production des biopesticides à base de Bt ; une liste standardisée de Matériels & Méthodes nécessaires ; Un inventaire de la métrologie alternative permettant d'étudier la souche Bt, spores et endotoxines ; Une comparaison objective des compétences des 3 souches (HD1, BLB1 et LIP) en utilisant un milieu de synthèse minimal, un sous-produit agricole normalisé comme milieu industriel et utilisé comme substrat pour une production à faible coût ; validation à l'échelle du laboratoire de conditions de cultures optimisées.

2-4- Application de la technique physique « Speckle » pour une évaluation « Online » de la production de biopesticides par fermentation

Le rendement de la fermentation de Bt en termes de production de □endotoxines est une caractéristique importante permettant de comparer la compétence de nouvelles souches par rapport à la souche commerciale HD1. L'évaluation de cette production peut être effectuée classiquement en utilisant plusieurs types d'analyses allant des essais biologiques aux diverses méthodes biochimiques. Les principaux inconvénients de ces méthodes sont leur coût et la durée de l'analyse. Une méthode physique alternative basée sur la diffusion de la lumière a été

développée afin de quantifier la formation de ces cristaux. Dans le cadre du projet européen BIOSMAN, une initiative d'application de cette caractérisation optique au suivi en temps réel de la réaction chimique de la fermentation a été entreprise. Elle visera à étudier les suspensions aqueuses de cristaux et / ou de spores; de souches de référence (HD1 et HD133) ainsi que des souches isolées provenant d'échantillons de sol libanais et tunisien (LIP et BLB1). Cette initiative ouvre la voie à l'utilisation potentielle de cette technologie à l'échelle industrielle en tant que technique peu coûteuse et non invasive afin de caractériser la taille des cristaux et d'évaluer le rendement de la production de cristaux dans la fermentation. Les travaux réalisés ont permis d'optimiser les protocoles de séparation des spores/cristaux et cristaux de différentes formes dans le but de les analyser séparément par la technologie en question et mettre au point les paramètres permettant l'évaluation respective de leurs taille on- line.

3-Bioinsecticides actifs contre les orthoptères : Étude des potentialités bio-insecticides de *Serratia marcescens* sur les larves du criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*)

Dans le but de développer des moyens de lutte biologique et d'enrichir la gamme des agents de lutte microbiologique contre le criquet pèlerin *S. gregaria* appartenant à l'ordre des orthoptères et causant de graves dégâts sur l'agriculture, une bactérie a été isolée des larves d'élevage du criquet. L'identification macroscopique, microscopique et moléculaire a montré qu'il s'agit de *Serratia marcescens*. L'étude de l'activité insecticide de cet entomopathogène a révélé une mortalité qui peut atteindre 80%. Les biotests de toxicité ont également montré que la combinaison de la phéromone d'agrégation phénilacétonitrile (PAN) avec *S. marcescens* augmente significativement et accélère la mortalité des larves. Par ailleurs, l'association de la phéromone et de la bactérie a bien affecté la santé des insectes traités en modifiant leur rythme respiratoire et cardiaque et en provoquant des modifications histologiques notables au niveau du tube digestif. De plus, elle a pu toucher la composition de l'hémolymphe par une diminution significative du nombre des hémocytes.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et le zymogramme des protéines produites par la bactérie ont montré que cette bactérie manifeste une forte activité protéolytique. La séparation électrophorétique en présence d'un marqueur de tailles a montré que la protéase sécrétée par la bactérie avait une taille d'environ 80 kDa.

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

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 en acides aminés du gène *inhA2* de la souche BUPM216 a montré que InhA2-216 présente une homologie de 93 avec InhA2 publiée.

Ce gène a été cloné dans le vecteur pET afin de le sur-exprimer chez E. coli et étudier son activité insecticide. Après la vérification de la réussite du clonage par PCR et par digestion enzymatique, le plasmide recombinant obtenu a été appelé pET-inhA2. Ce dernier a été transféré à la souche BL21(DE3). La souche recombinante ainsi obtenu a été appelé E-BL21(pET-inhA2). La mise en évidence de l'expression d'InhA2 a été réalisée par SDS-PAGE et par Western-Blot. La comparaison des profils protéiques (Figure 2A) a montré une bande intense d'environ 90 kDa chez E(pET-inhA2). En utilisant des anticorps polyclonaux anti-inhA, nous avons montré que cette bande correspondant à la protéine InhA2 (Figure 2B).

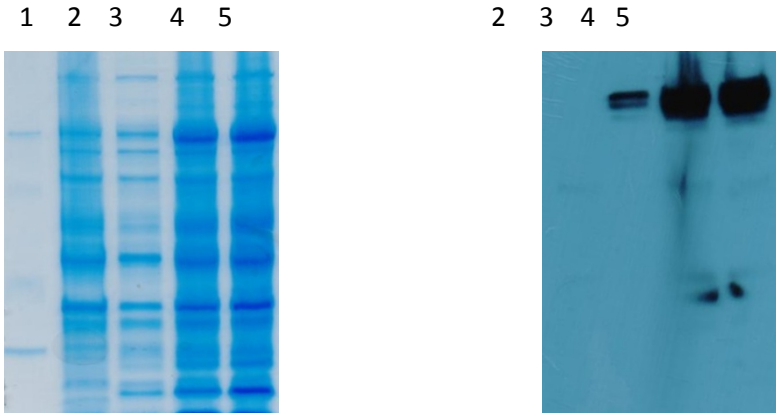


Figure 2: Mise en évidence de l'expression d'InhA2 chez *E. coli*. A: gel SDS-PAGE; B: Western Blot; Voies 1: Marqueur de taille, 2: E(pET), 3: E(pET-*inhA2*) sans induction, 4: E(pET-*inhA2*) induit 2h, 5: E(pET-*inhA2*) induit 4h

Projet 2 : Etude et production de biofongicides d'origines microbienne et végétale (Responsable : Pr K. JAMOUSSI)

1-Etude des activités fongicides de souches de *Bacillus* nouvellement isolées

La première partie de cette étude consiste à évaluer l'efficacité d'isolats bactériens nouvellement isolés à partir d'échantillons de sols, ce qui permettra de sélectionner les souches ayant les meilleures activités inhibitrices. Il s'agit d'étudier leurs pouvoirs antagonistes sur des champignons phytopathogènes tels que *A. niger*, *A. alternata*, *F. graminearum*, *F. culmorum* en vu de protéger le blé, une plante locale d'intérêt agricole sujette de maladies fongiques. Ainsi, différents spectres d'action ont été trouvés. L'investigation par PCR des gènes codants pour des bio-surfactants (iturine, surfactine, fongicine, bacillomycine) a montré certaines amplifications, suggérant la présence potentielle des opérons synthétisant l'iturine, la fengycine, la bacillomycine mais non la surfactine.

La deuxième partie de ce travail concerne le clonage du gène *chi140* de *B. thuringiensis* et son expression hétérologue chez *E. coli*. Le gène $chi140^{\Delta SS}$ dépourvu de la séquence codant la séquence signale a été cloné dans le plasmide pGEM-T easy. Il sera transféré au plasmide pKJD4 d'expression chez *E. coli* pour produire une chitinase tronquée mais portant une séquence signale ($OmpA^{SS}$) d'*E. coli* et de la séquence (6His). La localisation périplasmique de l'enzyme et sa purification sur colonne grâce à son étiquette 6His sont envisagées afin de tester son activité antifongique.

2-Evaluation de l'activité antifongique de *Photorhabdus temperata*

L'investigation de l'activité antifongique de *Photorhabdus temperata* a montré que l'extrait à l'éthyle acétate possède une capacité inhibitrice de la croissance du champignon *Alternaria alternata* et *Fusarium graminearum* avec une zone d'inhibition de 11 à 15 mm, respectivement. Alors que l'extrait à butanol présente une forte inhibition de la croissance de *Fusarium culmorum* avec une zone d'inhibition égale à 25 mm.

3-Étude *in-vitro* et *in-vivo* de la potentialité de 4 souches dotées d'importantes activités antifongiques à améliorer la résistance des plantes aux stress biotiques et abiotiques

Les bactéries dotées de multiples potentialités biologiques sont hautement demandées

pour la lutte contre différents facteurs de stress biotiques et abiotiques. Dans ce contexte, les deux souches halotolérantes *Bacillus velezensis* FMH2 et *Bacillus subtilis* FMH45, la souche sauvage *B. velezensis* BLB371 et le mutant *B. velezensis* M3-7, dotées d'un large spectre d'activité antifongique et d'importantes potentialités dans la lutte contre le stress salin, ont fait l'objet de l'étude de leur aptitude à tolérer hautes concentrations en métaux lourds.

Les résultats obtenus ont montré que les quatre souches sont dotées d'une importante capacité à croître en présence de différentes teneurs de métaux lourds avec des concentrations maximales tolérées (CMT) qui dépassent les 160 mM. Ces souches ont présenté aussi une capacité à former des biofilms, à produire des biosurfactants et des EPS.

L'étude de la germination des graines tomate traitées par les spores de ces bactéries en présence du sel ou des métaux lourds met l'accent sur les capacités de ces isolats à améliorer les indices de vigueur des graines en présence et en absence des facteurs de stress abiotiques.

Vue les importantes potentialités de ces souches à lutter simultanément contre les facteurs de stress biotique et abiotique, leur génome a été séquencé afin de déceler les gènes responsables de ces compétences. L'analyse de ces séquences est en cours.

Projet 3 : Etude et production de Bactéricides d'origines microbienne et végétale (Responsables : Dr O. FRIKHA & Pr S. TOUNSI)

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

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.

Au sein du laboratoire des Biopesticides et dans le cadre du développement d'un moyen de lutte biologique contre la maladie du feu bactérien, nous avons investigué l'activité antibactérienne d'une collection de 43 souches de *Bacillus* ; isolées du sol et des parties aériennes de pommiers et de poiriers ; vis-à-vis d'*E. amylovora*. Les souches de *Bacillus* ont été investiguées dans le but d'étudier les mécanismes d'action impliqués dans l'antagonisme contre *E. amylovora*. Ainsi, nous avons étudié la production de composés antibactériens contre *E. amylovora* et de sidérophores, la capacité de colonisation et de formation de biofilms.

L'investigation de l'activité antibactérienne *in vitro* des 43 souches a montré que celles isolées du sol et seulement la souche PF16 isolées des parties aériennes sont capables de produire des composés antibactériens contre *E. amylovora*. Les meilleures souches productrices de sidérophores sont 32a, 39b, 56b, 63a, PF12 et PF18. D'autre part, nous avons montré que la plupart des souches étudiées sont capables de coloniser le milieu et de former un biofilm. Les souches isolées du sol ont montré une forte capacité de colonisation du milieu tandis que quelques souches isolées des parties aériennes uniquement étaient performantes dans la colonisation comme PF11, PF12 et PF16. La formation de biofilms était également importante pour les souches 32a, 53b, 63b, PF2, PF3, PF5, PF11, PF12, PF22 et PF24.

Nous avons également étudié la capacité des 43 souches à contrôler la maladie du feu bactérien sur les feuilles de poirier détachées. Les souches 32a, 63a, 63b, PF2 et PF6 sont considérées comme les meilleures souches antagonistes. La souche 32a a montré l'efficacité la plus élevée qui était comparable à celle obtenue avec la streptomycine, utilisée comme pesticide de référence contre *E. amylovora.*

2-* Evaluation de l'activité antimicrobienne de *Photorhabdus temperata

Au cours de cette partie, nous avons investigué l'activité antibactérienne de la bactérie entomopathogène *Photorhabdus temperata,* souche K122 afin d'évaluer son efficacité par

rapport à un panel de souches de référence tel que les bactéries pathogènes à Gram+ (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococus faeacalis*), à Gram- (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et les phytopathogénes tel que *Agrobacterium tumefaciens.* Ainsi, suite à l'extraction liquide-liquide des métabolites secondaires par des solvants de polarité croissante, nous avons montré que l'extrait à l'éthyle acétate possède une forte activité antibactérienne contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *A. tumefaciens* avec un diamètre d'inhibition de 28, 24, 15 et 15 mm, respectivement. Par contre, l'extrait au butanol est doté d'une activité antibactérienne uniquement contre *A. tumefaciens et B. cereus*, avec un diamètre d'inhibition de 18 et 11 mm, respectivement. De plus, les résultats obtenus ont montré que l'extrait à l'éthyle acétate est un agent bactériostatique pour *B. cereus et S. aureus* et à la fois un agent bactéricide pour *P. aeruginosa.* Alors que l'extrait au butanol est un agent bactéricide pour uniquement les bactéries phytopathogènes.

3- Formulation d'un biopesticide à base de l'huile essentielle de thym et de géranium

Un screening d'une sélection de plantes aromatiques tunisienne à été réalisé, suite a cette étude nous avons constaté que l'huile essentielle de thym et de géranium sont les plus puissants au niveau des activités antibactérienne, antifongique et insecticide. Ainsi, nous avons optimisé la formulation d'un biopesticide à base de ces deux huiles. Le produit formulé était bien homogène avec et stable durant toute la durée de stockage qui est d'environ une année, à température ambiante.

3- Etude de la meilleur proportion éthanol/eau et l'extraction de thym par des nouvelles techniques

Dans le cadre d'un stage à l'Université d'Avignon au Laboratoire de « Green », nous avons optimisé la proportion en éthanol/eau qui maximalise la solubilisation et l'extraction des composés de thym notamment le thymol qui est le composant majoritaire. D'autre part, nous avons optimisé l'extraction du thym par des différentes méthodes notamment : la macération à T° ambiante, à 50°C et à T° d'ébullition, la méthode de broyage à bille, extraction par ultrasons à T° ambiante et à 60°C et l'extraction par micro-ondes. L'extraction par la méthode de macération à 50°C permet d'obtenir la plus importante concentration en thymol, suivie par la méthode de macération à T° d'ébullition et la méthode d'extraction par microonde (figure 3).

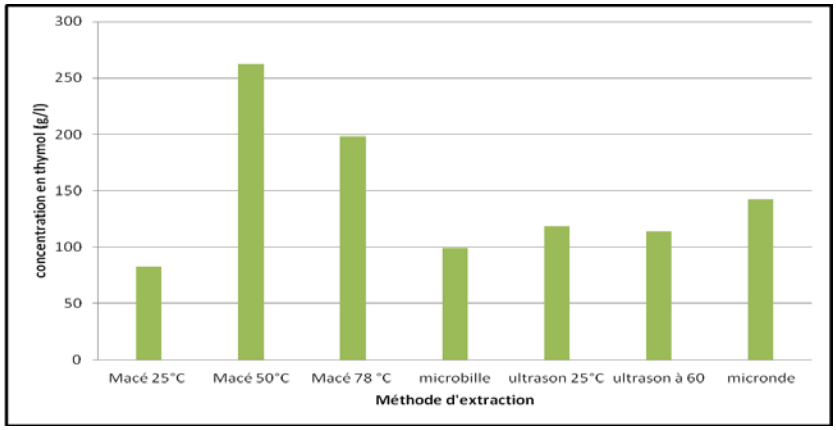


Figure 3: Rendement en thymol en utilisant différentes techniques

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Publications internationales parues en 2018:

1. Zghal, R. Z., Kharrat, M., Rebai, A., Khedher, S. B., Jallouli, W., Elleuch, J. & Tounsi, S. **(2018)**. Optimization of bio-insecticide production by Tunisian Bacillus thuringiensisisraelensis and its application in the field. ***Biological Control.***124, 46–52.
2. Zghal, R. Z., Ghedira, K., Elleuch, J., Kharrat, M., & Tounsi, S. **(2018)**. Genome sequence analysis of a novel Bacillus thuringiensis strain BLB406 active against Aedesaegypti larvae, a novel potential bioinsecticide. ***International journal of biological macromolecules.***116, 1153-1162.
3. DalelBenFarhat-Touzri, FatmaDriss, Sonia Jemli& Slim Tounsi **(2018)** Molecular characterization of Cry1D-133 toxin from *Bacillus thuringiensis* strain HD133 and its toxicity against *Spodopteralittoralis*.***International Journal of Biological Macromolecules.*** 112, 1-6.
4. Jallouli, W., Boukadi, H., Sellami, S., Frikha, F., Abdelkefi-Mesrati, L., & Tounsi, S **(2018)**. Combinatorial effect of Photorhabdusluminescens TT01 and Bacillus thuringiensis Vip3Aa16 toxin against Agrotissegetum. ***Toxicon.*** 52-57.
5. Boukedi, H., Tounsi, S. &Abdelkefi-Mesrati, L. **(2018)**. Insecticidal activity, putative binding proteins and histopathological effects of Bacillus thuringiensis Vip3 (459) toxin on the lepidopteran pest Ectomyeloisceratoniae. ***Actatropica,*** *182*, 60-63.
6. Abdallah, D. B., Frikha-Gargouri, O., & Tounsi, S. **(2018)**. Rizhospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain 32a. ***Biological Control.***
7. Hmani, M., Boukedi, H., Ben Khedher, S., Elleuch, A., Tounsi, S. & Abdelkefi-Mesrati, L. **(2018)**. Improvement of Vip3Aa16 Toxin Production and Efficiency Through Nitrous Acid and UV Mutagenesis of Bacillus thuringiensis (Bacillales: Bacillaceae). ***Journal of economic entomology.***111, Issue 1, 108–111.
8. Tabebi, M., Khabou, B., Boukadi, H., Hamad, M. B., Rhouma, B. B., **Tounsi, S.,** ... &Mnif, M. **(2018)**. Association study of apoptosis gene polymorphisms in mitochondrial diabetes: A potential role in the pathogenicity of MD. ***Gene,*** 639, 18-26.
9. Mhalla D, ZouariBouassida K, Chawech R, Bouaziz A, Makni S, Jlaiel L, Tounsi S, MezghaniJarraya R, Trigui M. **(2018)** Antioxidant, Hepatoprotective, and Antidepression Effects of Rumextingitanus Extracts and Identification of a Novel Bioactive Compound. **Biomed Res Int.**doi: 10.1155/2018/7295848.
10. Zouari Karama Bouassida,Samar Makni,Amina Tounsi,LobnaJlaiel,Mohamed Trigui and Slim **Tounsi** (2018) Effects of Juniperusphoenicea Hydroalcoholic Extract on Inflammatory Mediators and Oxidative Stress Markers in Carrageenan-Induced Paw Oedema in Mice. **BioMed Research International**. doi.org/10.1155/2018/3785487 Article ID 3785487.
11. Abdallah DB, Tounsi S, Gharsallah H, Hammami A, Frikha-Gargouri O. (**2018**) Lipopeptides from Bacillus amyloliquefaciens strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen Agrobacterium tumefaciens. **Environ SciPollut Res Int**. doi: 10.1007/s11356-018-3570-1.
12. Mhalla D, Ben Farhat-Touzri D, Tounsi S,Trigui M. (**2018**) Combinational Effect of *Rumextingitanus* (Polygonaceae) Hexane Extract and *Bacillus thuringiensis* δ-Endotoxin against *Spodopteralittoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biomed Res Int.**doi: 10.1155/2018/3895834.
13. DorraBen Abdallah, SlimTounsi, OlfaFrikha-Gargouri (**2018**) Inoculum type affect the efficacy of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens.* Applied Soil Ecology. 134:25-30.
14. Boukedi H, Ben Khedher S, Abdelkefi-Mesrati L, Van Rie J, Tounsi S. (**2018**) Comparative analysis of the susceptibility/tolerance of Spodopteralittoralis to Vip3Aa, Vip3Ae, Vip3Ad and Vip3Af toxins of Bacillus thuringiensis. **J InvertebrPathol**. 152: 30-34. doi: 10.1016/j.jip.2018.01.006.
15. Sellami S, Jemli S, Abdelmalek N, Cherif M, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S, Jamoussi K (**2018**) A novel Vip3Aa16-Cry1Ac chimera toxin: Enhancement of toxicity against Ephestiakuehniella, structural study and molecular docking.**Int J BiolMacromol**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.161.

16. R, Frikha F, Elleuch J ZribiZghal, Darriet F, Chandre F, Jaoua S, Tounsi S. (**2018**) The combinatory effect of Cyt1Aa flexibility and specificity against dipteran larvae improves the toxicity of *Bacillus thuringensis*kurstaki toxins.**Int J BiolMacromol**. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.226.
17. Gharsallah, H., Frikha-Gargouri, O., Bom, R. J., Hammami, A., & Bruisten, S. M. (2018). Comparison of reverse hybridization and ompA sequencing methods applied on Chlamydia trachomatis strains from Tunisia. **Microbiology open,** DOI: 10.1002/mbo3.549
18. Zouari-Bouassida K, Trigui M, Makni S, Jlaiel L, Tounsi S (2018) Seasonal Variation in Essential Oils Composition and the Biological and Pharmaceutical Protective Effects of Mentha longifolia Leaves Grown in Tunisia **Biomed Res Int,** https://doi.org/10.1155/2018/7856517
19. BenFarhat-Touzri D, Jemli S, Driss F, Tounsi S (2018) Molecular and structural characterization of a novel Cry1D toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae) **Int J Biol Macromol,** 126:969-976. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.175.

II/ BREVET:

1/ Titre: Mise au point d'un nouveau procédé de production des biopesticides à base d'une souche de Photorhabdus

Inventeurs : Jallouli Wafa, Keskes Sahar, Tounsi Slim **(2018). INORPI-TN 2018/0209**

FORMATION DIPLOMANTE:

Habilitation :

Olfa Frikha-Gargouri : Habilitation Universitaire, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, Titre : « Potentialité des souches sporulantes dans la lutte contre les maladies bactériennes des plantes : la galle du collet et le feu bactérien » 24-11-2018

Thèses

Yosra Kahla: Investigation bilogique et physico-chimique et applications biotechnologiques de biomolécules actives d'origine végétale. DOCTORAT dans la discipline « Sciences Biologiques » de la Faculté des Sciences de Sfax, soutenue le 11-07-2018. Directeur de thèse Slim TOUNSI.

Mastères

1- Emna Ben Khalifa: Mastère de recherche (régime LMD), spécialité Biotechnologie Microbienne de. Faculté des Sciences de Sfax. Titre : « comparaison of the growth of rates of the wild strain WK6 of E. coli and the modified strain (production of recombinant protein)». Encadrant : Pr Slim Tounsi (Soutenance : Décembre 2018).

2- OumaimaLoukil: Master en Biodiversité et Dynamique des Ecosystèmes, Faculté des Sciences de Sfax, Titre : « Investigation des delta-endotoxinesde lasouche BUPM55 de*Bacillus thuringiensis*active contre lesmoustiques» 2016-2017. Encadreur : Raida Zribi Zghal. (Soutenance : 31/12/2018).

3-YosraFrikha: Mastère de recherche spécialité Génomique et Protéomique de la FSS, intitulé du sujet : Titre : « Investigation de l'activité antagonisted'une collection de souches de *Bacillus* contre *Erwinia amylovora*, agent causal du feu bactérien». Encadreur : Olfa Frikha Gargouri. (Soutenance : 28/12/2018).

OUVERTURE DU LABORATOIRE SUR SON ENVIRONNEMENT

1- Organisation d'un cours théorique et pratique « Bacillus thuringiensis genome sequencing: from DNA extraction to annotation through NGS technology, 4 - 13 Novembre Sfax, Tunisia» Financé par ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology).

Organisation dans le cadre du projet IPM-4-Citrus de :

1/ Conférence et Atelier théorique « Culture for Bioreactors (management, instrumentation, modelling) » le 20 Avril 2018 au CBS- Sfax, Tunisie

2/ Table ronde « Acceptability of Biopesticides by civil society» le 20 Avril 2018 à Sfax, Tunisie

3/Atelier pratique « Cell culture for Bioreactors (management, instrumentation, modelling) » du 24 au 30 Juin 2018 au CBS- Sfax, Tunisie

4/ Atelier pratique « Data treatments and bio-kinetics modeling» du 24 au 27 Octobre 2018 au CBS-Sfax; Tunisie

PROJETS INTERNATIONAUX EN COURS 2018:

1. **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).**
2. **Projet** 2- Development of microbial agents for control of plant diseases and insect pests **(2016-2018**), **TUN-GER Cooperation**
3. **Projet 3-** IPM-4-Citrus: Citrus disease Integrated Pest Management: from Research to Market (**2017-2020**), **RISE-H2020**
4. **Projet 4-** BIOSMAN: Towards real-time monitoring of *Bacillus thuringiensis* biopesticides production using laser Speckle imaging within a Mediterranean area network (**2017-2020**), **ERANETMED**
5. **Projet 5-** Huplant Control: Control of human pathogenic micro-organisms in plant systems **(2017-2021), COST-H2020**
6. **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**

7. **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***
8. **Projet 8 :** Valorisation des eaux salines dans le domaine agricole après magnétisation.
9. 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**
10. **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)

مخبر البيوتكنولوجيا وتحسين النباتات

Responsable : Pr. Faiçal BRINI

Email : faical.brini@cbs.rnrt.tn

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	Qualité	Nom et Prénom	Qualité
Faiçal Brini	Professeur/Directeur du Laboratoire	Mohamed Brahmi	Agent de Laboratoire
Habib Khoudi	Professeur	Sahar Sellami	En Thèse
Walid Saibi	Maitre de Conférences	Sana Koubaa	En Thèse
Inès Yakoubi	Maitre Assistant	Mariem Bradaii	En Thèse
Mouna Choura	Maitre Assistant	Habib Mahjoubi	En Thèse
Mohamed Nejib Saidi	Maitre Assistant	Marwa Harbaoui	En Thèse
Rania Ben Saad	Maitre Assistant	Hassiba Bouazzi	En Thèse
Ikram Zaidi	Maitre Assistant	Dhawiya Merghebi	En Thèse
Anis Ben Hssouna	Maitre Assistant	Hajer Ziadi	En Thèse
Mouna Ghorbel	Post-doc	Sawssen Harzalli	En Thèse
Sana Tounsi	Post -doc	Marwa Guiza	En Thèse
Héla Safi	Post -doc	Marwa Bouhlel	En Thèse
Rania Jmal	Post -doc	Khawla Missaoui	En Thèse
Karama Hamdi	Post -doc	Hanen Kamoun	En Thèse
Nabil Zouari	Post -doc	Ons Bahloul	En Mastère
Malika Ayadi	Ingénieur Principal	Ikram Zribi	En Mastère
Chedya Boughanmi	Technicien	Naima Sayahi	En Mastère
Sarra Namani	Secrétaire	Bouthaina BelHaj	En Mastère
Emna Khanfir	Ingénieur contractuel	Nourhène Mathlouthi	PFE/ENIS

OBJECTIFS GENERAUX:

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

OBJECTIFS SPECIFIQUES:

La culture des céréales en Tunisie est généralement soumises à des contraintes hydriques dues essentiellement à une sécheresse fréquente à la quelle vient s'ajouter des problèmes de salinisation des sols. Cette situation est souvent aggravée par l'apparition de maladies comme la rouille, la septoriose, le fusarium,.. La tolérance des plantes aux stress biotiques et abiotiques est sujette à des variations alléliques naturelles gouvernées par plusieurs gènes.

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

LISTE DES PROJETS

1- Projet 1: Gènes candidats de la tolérance aux stress abiotiques : Isolement, pyramidage et expression chez des plantes d'intérêt économique (Responsable : Pr H. KHOUDI)
2- Projet 2 : Signalisation et mécanismes de tolérance aux stress (Responsable : Pr M. HANIN)
3- 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 (Responsable : Dr I. YAKOUBI)

4- Projet 4: Exploration et valorisation des macromolécules associées au stress chez les plantes (Responsable : Pr F. BRINI)

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 (Responsable : Pr H. KHOUDI)

1. Facteurs de transcription répondant à l'éthylène : Isolement d'un gène *PR5* fortement induit par l'expression ectopique du facteur de transcription TdSHN1 du blé dur

Nous avons rapporté précédemment (Djemal et Khoudi, 2016, 2019) 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. L'analyse moléculaire par RT-PCR des lignées transgénique a révélé que *TdSHN1* induit fortement l'expression de plusieurs gènes. Le gène *PR5* de tabac figure parmi ses gènes et son expression, par rapport aux plantes sauvages non transformées, a été augmentée d'environ 3 fois. Pour cela, nous avons entrepris des travaux supplémentaires visant l'isolement de un ou plusieurs gènes homologues au gène *PR5* de tabac à partir des variétés Tunisienne de blé dur afin d'explorer le ou les mécanismes permettant de comprendre le lien possible entre les facteurs de transcription *TdSHN1* et les gènes *PR5*. Dans un premier temps, nous avons procédé par un alignement des séquences codantes pour des homologues de *PR5* chez les céréales. Ceci nous a permis d'identifier des régions conservées qui ont servis à dessiner des amorces pour amplifier des homologues *PR5* chez le blé dur. Ces amorces ont permis d'amplifier des fragments de taille attendus à partir de la variété tunisienne de blé dur om Rabiaa et qui se sont révélée homologues aux séquences *PR5* disponibles dans la base des données NCBI. Afin d'établir si l'expression du gène *PR5*, en présence de divers stress abiotiques (salinité et mannitol), est corrélée à l'expression du gène codant pour le facteur de transcription *TdSHN1*. Pour se faire, le profil d'expression des gènes *PR5* et *TdSHN1* ont été étudié en utilisant la technique de RT-PCR quantitative. Les résultats ont montré qu'effectivement l'expression du gène *PR5* est fortement induite par les stress salin et osmotique et est corrélée à l'expression du facteur d'expression *TdSHN1* à 1h et 24 h après l'imposition du stress (Fig. 1). Ceci suggère un lien fonctionnel entre le facteur de transcription *TdSHN1* et le gène *PR5* dans le mécanisme de tolérance au stress abiotique chez le blé dur.

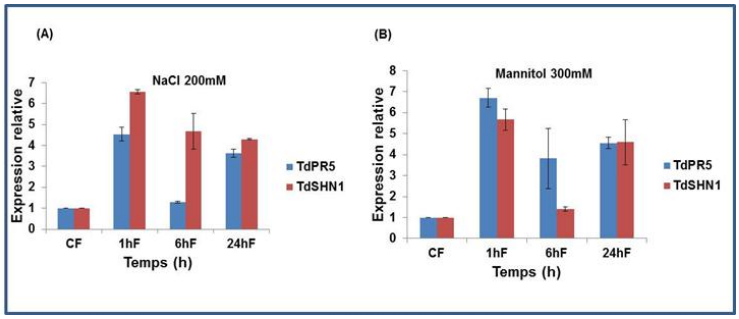


Figure 1: Etude de l'expression par RT-PCR quantitative des gènes *PR5* et *TdSHN1* dans les feuilles de la variété Oum Rabiaa. Suite à un stress salin (200 mM) (A) et osmotique mannitol (300 Mm) (B).CF, condition contrôle 0 h, 1 hF, 6 hF et 24 hF ; 1 h, 6 h et 24 h après le début de stress, respectivement.

2. Les Facteurs de transcription NAC

L'objectif de cette action de recherche consiste à identifier les membres de la famille de facteurs de transcription de type NAC chez le blé dur. Ainsi, 165 gènes codant pour les facteurs de

transcription de type NAC complet ont été identifiés chez le blé dur. 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 (Arabidopsis et vigne). En outre, L'étude d'expression *in silico* des gènes NAC en utilisant les données de type RNA-seq a permis de choisir 10 gènes candidats impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. L'étude d'expression de ces gènes candidats par RT-qPCR a montré que leurs expression est modulés par le stress et hydrique. En suite, on a focalisé sur deux gènes pour des études fonctionnelles, il s'agit de deux gènes homologues nommé TtNAC2A et TtNAC2B impliqués dans la réponse aux stress abiotiques. L'analyse comparative de leurs promoteurs a révélé la présence de nombreux éléments cis-régulateurs associés au stress. Les régions promotrices de ces gènes ainsi que leurs séquences codantes ont été isolées et on servit pour la génération de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant ces deux gènes ainsi que leurs promoteurs. Les études phénotypique et moléculaires des ces plantes est en cours.

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 de certaines variétés de blé dur aux stress abiotiques, nous avons utilisé *Aeluropus littoralis* comme source de gènes ayant un rôle dans les mécanismes de tolérance à ce type de stress. Nous avons isolé le gène *AlSRG1* codant pour une nouvelle protéine 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. Nos résultats par qRT-PCR ont montré que ce gène est fortement induit par NaCl et PEG. En se basant sur ces éléments et dans le but d'étudier sa région régulatrice, le promoteur du gène *AlSRG1* a été isolé et cloné en fusion avec le gène *gusA* afin de transformer le riz (*Oryza sativa*). Cette séquence a une taille d'environ 1515 pb à partir du site d'initiation de la transcription (+1). L'analyse globale *in silico* de la séquence identifiée par le programme PLANTCARE et PLACE ont permis de mettre en évidence la présence de nombreuses boites régulatrices répondant à différents types de signaux (hormonaux, lumière, défense, sécheresse, réponse aux stress,..) nécessaires à la régulation de l'expression des gènes induits par des stress biotiques et abiotiques et certains éléments *en cis* impliqués dans l'expression tissus vasculaires. En plus, l'analyse a révélé la présence de plusieurs sites potentiels de liaison pour les facteurs de transcription tels que: MYB, MYC, WRKY et Dof. L'analyse histochimique et histologique des plantes transgéniques obtenues a montré que ce promoteur est inductible par les stress abiotiques ainsi par les stress hormonaux: ABA et acide salicylique (Fig. 2). En conclusion, nous avons pu isoler un promoteur inductible par divers types de stress abiotique qui pourra être exploité dans des applications biotechnologiques visant à améliorer la tolérance de plantes cultivées aux stress abiotiques.

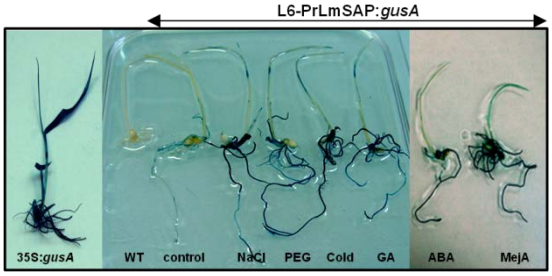


Figure 2 : Visualisation de l'expression du gène rapporteur *gusA* dans les plantes transgéniques de riz en réponse à l'application de différents stress abiotiques et hormonaux.

Afin de transformer du blé dur, le gène *AlSRG1* a été cloné dans le vecteur binaire pC0390 sous contrôle du promoteur Ubiquitine1 du maïs (Ubi-1). La construction résultante a été transformé dans les embryons matures du blé dur via la méthode « *In embryo transformation* » de transformation par *Agrobacterium* sans utiliser la culture *in vitro*. Des plantes transgéniques de blé dur marker-free surexprimant le gène *AlSRG1* ont été produites. Ces plantes de première génération (F1) ont été testées par PCR pour confirmer l'intégration du transgène dans le génome du blé. L'analyse moléculaire des plantes transgéniques de la génération (F2) a confirmé l'intégration et l'expression du transgène. Des essais sur le plan physiologique et moléculaire sont en cours pour mieux caractériser ces lignées transgéniques pour leur niveau de tolérance au stress salin et hydrique.

Projet 2 : Signalisation et mécanismes de tolérance aux stress (Responsable : Pr M. HANIN)

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

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

2. Etude des protéines intrinsèquement désordonnées chez les céréales

Au cours de ces quinze dernières années, le paradigme « structure-fonction » a été remis en

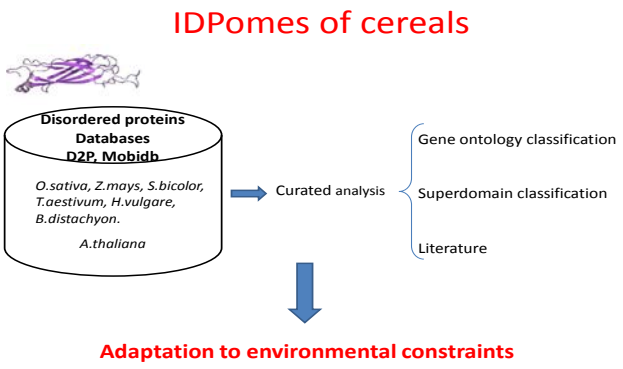
cause par la découverte des protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs), à savoir des protéines dépourvues de structure secondaire et tertiaire stables en conditions physiologiques de pH et salinité et en l'absence d'un partenaire ou ligand. Cependant, les protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) 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 *Oryza sativa*, *zea mays*, *sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* and *Brachypodium distachyon*. Les pourcentages de désordre sont similaires entre les espèces étudiés. D'autre part, les analyses de Gene Ontology (GO) montrent que les IDPs sont surtout impliqués dans les processus de régulation cellulaires et métaboliques, et particulièrement dans la réponse aux stimuli environnementaux. Par ailleurs, on trouve que les IDPs sont enrichies dans les voies de synthèses de métabolites et des composés aromatiques. Une étude comparative avec la plante modèle *Arabidopsis thaliana* révèle des résultats similaires avec les céréales étudiées. L'ensemble de ces données suggère que les plantes utilisent un mécanisme cellulaire commun pour l'adaptation aux contraintes environnementales.

Afin d'étudier l'importance du désordre, via les IDPs chez les céréales, une analyse bioinformatique a été effectuée sur les protéomes du riz, du maïs, du sorgho, du blé, de l'orge et *Brachypodium distachyon* en comparaison avec la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Les IDPs ont été prédites par :

- le calcul du pourcentage d'acides aminés promoteurs d'ordre ou de désordre
- le dénombrement de séquences d'au moins 30 acides aminés promoteurs de désordre.

La figure 3 ci-dessous montre l'approche *in silico* adoptée :



1/Les IDPs de *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, et *Brachypodium distachyon* déjà disponibles dans les banques de données ont été récupérées. En combinant plusieurs outils VL-XT, VSL2b, Espritz, PrDOS, PV2 et IUPred qui se basent sur différentes méthodes, les pourcentages du désordre de ces protéomes ont été calculés. Les calculs révèlent que pour chaque prédicteur, toutes les espèces testées ici présentent des pourcentages comparables de désordre du protéome. Ensuite, les IDPs sont soumises à une analyse fonctionnelle qui se base sur l'ontologie (GO analysis) suivie d'une prédiction de la localisation des régions désordonnées au sein des domaines structurés identifiés par les annotations SCOP.

2/Cependant, aucune information n'existe sur le niveau du désordre chez le blé et l'orge. En adoptant la même stratégie mentionnée ci-dessus, les IDPs du blé et de l'orge ainsi que les régions désordonnées de fixation (DBR) ont été prédites, récupérées et analysées. Les pourcentages de désordre des protèomes du blé et de l'orge sont respectivement 27% et 29%. Les résultats ont permis d'obtenir des tendances générales qui montrent que les IDPs chez les

céréales ainsi que chez *A. thaliana* sont principalement impliquées dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques et dans la réponse au stress. La conservation des caractéristiques au cours de l'évolution renforce le rôle des IDPs pour le fitness et la survie des plantes dans des environnements changeants.
A l'issue de ces analyses, toutes les IDPs des protéomes étudiées sont récupérées et annotées ainsi que leurs données GO et superfamilles associées et font l'objet d'une base de données en cours de construction.

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 (Responsable : Dr I .YAKOUBI)

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. Ce projet et à travers ses différentes actions a permis :

A. La formation d'une collection du blé dur représentant un siècle de blé dur en Tunisie. Deux années de ce projet ont été consacrées à la multiplication et l'épuration de certaines « variétés locales » , des variétés couramment utilisées par les agriculteurs et aussi des accessions Tunisiennes de blé dur, récupérées de la banque de gènes de la Corée du sud, afin de former le CBS « Durum Wheat Collection »
B. Evaluation agronomique en plein champs
C. Evaluation de la qualité physicochimique, technologique et biochimique de certaines variétés /landraces Tunisiennes de blé dur.
D. 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
   - 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. La collection « CBS durum wheat collection » représentant un siècle de blé dur en Tunisie, 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 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. Une variabilité génétique pourrait être derrière cette variabilité du potentiel allergène de ces différentes variétés. L'analyse combinée de la variance des données a révélé un effet important du génotype, de l'environnement et de leur interaction.
   - Les peptides impliqués dans la maladie cœliaque : 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 (Responsable : Pr F. BRINI)

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

En Tunisie, l'orge est la deuxième céréale après le blé. Caractérisé par une capacité de tolérance naturelle à la déshydratation. Ce ci incite les chercheurs à exploiter son patrimoine génétique par la recherche des gènes impliqués dans la réponse aux contraintes environnementales et les explorés pour améliorer la tolérance des espèces cultivées principalement les céréales. Les déhydrines (DHNs) sont des protéines hydrophiles qui s'accumulent en réponse à la déshydratation. L'objectif de cette étude consiste à élucider les mécanismes moléculaires par lesquels les déhydrines (et en particulier DHN4) contribuent à la tolérance aux stress abiotiques chez l'orge. Les donnés fournis vont être extrapolé pour améliorer par la suite la tolérance d'autre plantes d'intérêt économique. Une déhydrine (Rh DHN4) a été isolé à partir Rihane, une variété d'orge cultivée en Tunisie relativement tolérante à la sécheresse. Sa séquence complète est accessible dans la base de données (Gene Bank) sous le n° d'accession : MK465502. Une étude du niveau d'expression de ce gène a été faite chez deux variétés d'orge qui présentent une différence de tolérance à la sécheresse .Une variété sensible Manel et une variété tolérante Rihane. Les résultats indiquent que l'expression de DHN est régulée par divers types de stress abiotiques ce ci suggère que cette protéine pourrait être impliquée dans la modulation de la réponse d'orge à divers types de stress abiotiques. Fait intéressant, DHN est régulé par le stress salin et le traitement par le froid de manière différentielle chez les deux variétés. Ceci montre que DHN pourrait intervenir d'une manière différente chez ces deux variétés. Dans le cadre de l'étude fonctionnelle de RhDHN4 *in vitro*, une étude de son implication dans la protection de l'activité et la thermostabilité de la LDH (lactate déshydrogénase) a été investiguée (Fig. 4).

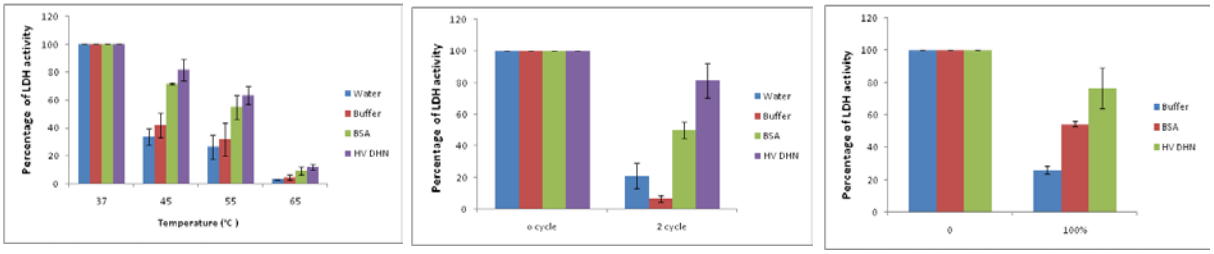


Figure 4 : Effet de DHN d'orge sur l'activité de LDH en condition de stress par la chaleur, le froid et la déshydratation

Les résultats obtenus montrent que la DHN d'orge est capable de protéger la LDH et préserver son activité enzymatique lors d'un stress par la chaleur, le froid et la déshydratation.

L'expression de RhDHN4 chez la levure confère une tolérance aux contraintes environnementales. L'ensemble de ces actions nous fournirait une idée sur le rôle de cette DHN dans le mécanisme de tolérance aux contraintes environnementales chez l'orge.

2/ Les végétaux sont soumis à un grand nombre de contraintes environnementales de nature biotique et abiotique. Au niveau cellulaire, ces contraintes entrainent la production rapide et massive des ROS comme les $O2^{\bullet-}$, H_2O_2, et $OH^{\bullet}$. Les plantes possèdent un mécanisme de défense antioxydant complexe formé des composants enzymatiques et non enzymatiques dont le

rôle est de neutraliser ces ROS. La superoxyde dismutase (SOD) est considéré comme la première enzyme antioxydante de défense contre le stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation de l'$O_2^{\cdot -}$ en oxygène O_2 et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Ce dernier est rapidement métabolisé par la catalase en H_2O et O_2. Il est bien établi que les SODs et les CATs jouent un rôle primordial dans la réponse des plantes aux stress environnementaux.

Dans ce contexte, nous avons identifié et cloné deux enzymes antioxidantes la superoxyde dismutase (*TmMnSOD*) et la catalase (*TmCAT1*) à partir de *Triticum monococcum*, un ancêtre de blé ayant le génome A.

Dans une première partie, l'alignement multiple de séquence de TmMnSOD avec leurs homologues de blé et de riz a montré la présence des domaines conservés caractéristiques des SODs. L'étude du profil d'expression de ce gène a montré qu'il est fortement induit par divers stress abiotiques. Nous avons également montré que *TmMnSOD* est capable de conférer une meilleure tolérance aux stress abiotique tels que le NaCl, le PEG, la chaleur et le stress oxydatif chez la levure transgénique (Fig. 5).

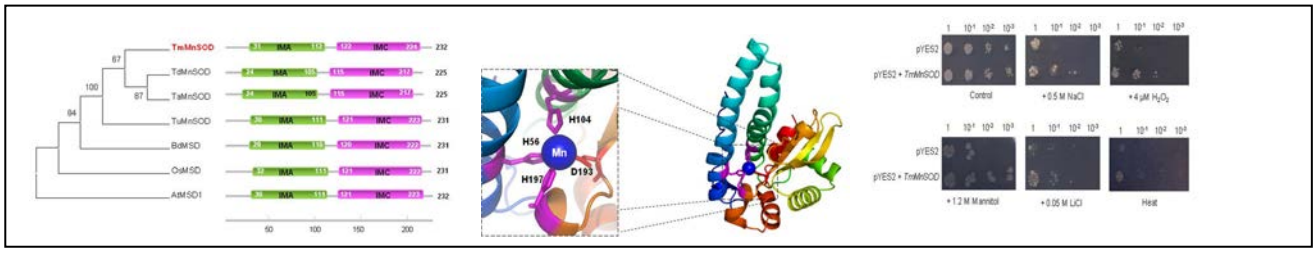


Figure 5 : Identification et caractérisation fonctionnelle de *TmMnSOD* du blé dur

Dans une deuxième partie, le gène *TmCAT1* a été isolé à partir de l'engrain. Les analyses bioinformatiques ont permis de confirmer qu'il appartient à la famille des catalase puisqu'il contient le domaine central de catalase et le domaine immuno-sensible à la catalase caractéristiques des CATs. L'expression du gène *TmCAT1* a été analysée par RT-PCR en temps réel. Ces analyses montrent bien que *TmCAT1* est fortement induit par le stress salin, osmotique, oxydatif et ABA. Son expression dans la levure transgénique a également permis de conférer à cette dernière la tolérance aux divers types de stress (Fig. 6).

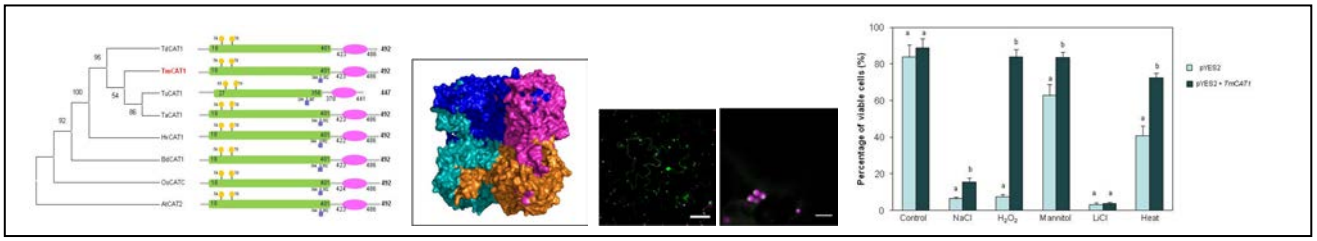


Figure 6 : Identification et caractérisation fonctionnelle de *TmCAT1*du blé dur

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

La Tunisie est un grand importateur de blé dur et souffre, par conséquent, d'une forte dépendance de l'extérieur. Il devient, donc urgent, d'orienter la recherche vers la création des variétés de blé dur plus tolérante au stress abiotique et biotique. Cette création passe obligatoirement par la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes aux stress salin et hydrique. L'approche adoptée par notre laboratoire est multidisciplinaire basée sur des outils bioinformatiques, moléculaires, biochimiques et de transgénèse végétale. A la fin de ce contrat programme 2015-2018, nous avons pu identifier plusieurs gènes candidats utilisables pour la création et la valorisation de nouvelles ressources phytogénétiques en

céréales. La valorisation de certaines protéines associées au stress et/ou enzymes qui peuvent servir pour des applications biotechnologiques et industrielles était aussi parmi les objectifs finaux de ce contrat programme. En perspectives, nous comptons adopter la même stratégie pour afin de sélectionner des variétés de blé dur à bon rendement mais aussi tolérant aux stress abiotiques et biotiques.

Publications Internationales parues en 2018

1/ Ben-Saad R, Ben-Halima N, Ghorbel M, Zouari N, Ben-Romdhane W, Guiderdoni E, Al-Doss A et Hassairi A (**2018**) AlSRG1, a novel gene encoding an RRM-type RNA-binding protein (RBP) from Aeluropus littoralis, confers salt and drought tolerance in transgenic tobacco***. Environmental and Experimental Botany***, 150: 25-36.

2/ Ben-Saad R, Ben-Hsouna A, Saibi W, Ben-Hamed K, Brini F et Ghneim-Herrera T (**2018**) A stress-associated protein, LmSAP, from the halophyte Lobularia maritima provides tolerance to heavy metals in tobacco through increased ROS scavenging and metal detoxification processes. ***Journal of plant physiology*.** 231: 234-243.

3/ Ben Hsouna A, Gargouri M, Dhifi W et Saibi W (**2018**) Antioxidant and hepato-preventive effect of Citrus aurantium extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats and characterisation of its bioactive compounds by HPLC-MS. ***Archives of physiology and Biochemistry***. 1-12.

4/ Sahnoun M, Saibi W, Brini F et Bejar S (**2018**) Apigenin isolated from A. americana encodes Human and Aspergillus oryzae S2 α-amylase inhibitions: credible approach for antifungal and antidiabetic therapies. ***Journal of Food Science and Technology***. 1-10.

5/ Mahjoubi H, Tamari Y, Takeda S, Bouchabké-Coussa O, Hanin M, Herzog E, Schmit A-C, Chabouté M-E et Ebel C (**2018**) The wheat TdRL1 is the functional homolog of the rice RSS1 and promotes plant salt stress tolerance. ***Plant Cell Reports***. 37(12): 1625-1637.

6/ Bradai M, Mahjoubi H, Chini A, Chabouté M-E, Hanin M et Ebel C (**2018**) Genome wide identification of wheat and Brachypodium type one protein phosphatases and functional characterization of durum wheat TdPP1a. ***PloS One*.** 13(1): e0191272.

7/ Ben-Romdhane W, Ben-Saad R, Meynard D, Zouari N, Mahjoub A, Fki L, Guiderdoni E, Al-Doss A et Hassairi A (**2018**) Overexpression of AlTMP2 gene from the halophyte grass *Aeluropus littoralis* in transgenic tobacco enhances tolerance to different abiotic stresses by improving membrane stability and deregulating some stress-related genes. ***Protoplasma***. 255(4): 1161-1177.

8/ Choura M, Brini F (**2018**) Disorder and interactions: What can dehydrins in cereals tell us anymore? ***Network Biology***. 8(4): 137.

9/ Klay I, Gouia S, Liu M, Mila I, Khoudi H, Bernadac A, Bouzayen M et Pirrello J (**2018**) Ethylene Response Factors (ERF) are differentially regulated by different abiotic stress types in tomato plants. ***Plant Science***. 274: 137-145.

10/ Djemal, R, Mila I, Bouzayen M, Pirrello J et Khoudi H, (**2018**) Molecular cloning and characterization of novel WIN1/SHN1ethylene responsive transcription factor *HvSHN1* in barley (*Hordeum vulgare L.*). ***Journal of Plant Physiology***. 228: 39-46.

11/ Bouzroud S, Gouiaa S, Hu N, Bernadac A, Mila I, Bendaou N, et al. (**2018**) Auxin Response Factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum lycopersicum*). **PLoS ONE** 13(2): e0193517.

12/ Boukid F, Vittadini E, Prandi B, Mattarozzi M, Marchini M, Sforza S, Sayar R, Seo Y W, Yacoubi I et Mejri M (**2018**) Insights into a century of breeding of durum wheat in Tunisia: The properties of flours and starches isolated from landraces, old and modern genotypes. ***LWT*.** 97: 743-751.

13/ Tounsi S, Feki K, Saïdi M N, Maghrebi S, Brini F et Masmoudi K (**2018**) Promoter of the TmHKT1; 4-A1 gene of Triticum monococcum directs stress inducible, developmental regulated and organ specific gene expression in transgenic Arbidopsis thaliana. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***. 34(7): 99.

14/ Belgaroui N, Lacombe B, Rouached H et Hanin M (**2018**) Phytase overexpression in Arabidopsis improves plant growth under osmotic stress and in combination with phosphate deficiency. *Scientific*

Reports, 8(1): 1137.
15/ Kim S H, Kim D Y, Yacoubi I et Seo Y W (**2018**) Physiological and Genetic Responses of Salt-stressed Tunisian Durum (*Triticum turgidum* ssp. durum) Cultivars. ***Korean Journal of Crop Science***. 63(4): 314-321.
16/ Ben Saad R, Farhat-Khemekhem A, Ben Halima N, Ben Hamed K, Brini F, Saibi W **(2018)** The LmSAP gene isolated from the halotolerant Lobularia maritima improves salt and ionic tolerance in transgenic tobacco lines. ***Functional Plant Biology***, 45 (3):378-391.

Formation Diplômante

I/ Thèses Soutenues en 2018

1/ Rania Jmal Abid (31/01/2018 à la FSS, Directeur de thèse : Habib Khoudi).

2/ Karama Hamdi (10/03/2018 à la FSS, Directeurs de Thèse : Faiçal Brini & Inès Yakoubi)**.**

3/ Habib Mahjoubi (20/09/2018 à la FSS, Directeurs de Thèse : Moez Hanin & Marie-Edith Chaboute).

II/ Mastères Soutenus en 2018

1/ Naima Sayahi (23/11/2018 à la FSS, Encadreur : Anis Ben Hssouna).

2/ Ons Bahloul (15/12/2018 à la FSS, Encadreur : Habib Khoudi).

Conventions avec des partenaires scientifiques et socio-économiques en 2018

- **Convention** LBAP, CBS/ Sapienza University of Roma-Italy.

Séminaires, journées et ateliers scientifiques en 2018

- Organisation d'un Workshop dans le cadre du projet TUNGER, et ce le 06/12/2018 au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) : Intitulé du Workshop: 'Genetically engineering of hypoallergenic plant foods''.

Projets de coopération en cours ou acceptés en 2018

1/Programme Jeune Enseignants Chercheurs (2018-2019) (*18PJEC06-02)* Intitulé : ''Etude des protéines intrinsèquement désordonnées chez les céréales''.
2/Projet Tuniso-Allemand (2017-2018) (TUNGER PEI-CBS15), intitulé: ''Lipid transfer protein (LTP): an interface between plant defence and human allergy''.

LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB)

مخبر الأحياء الدقيقة والجزيئات الفعالة

Responsable : Pr. Lotfi MELLOULI

Email : lotfi.mallouli@cbs.rnrt.tn

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Corps A

Grade	Nom et prénom	Etablissement	Université
Professeurs	MELLOULI Lotfi	CBS	Sfax
	CHOUAYEKH Hichem	CBS	Sfax
	BEN SALAH Riadh	CBS	Sfax
	KAMOUN Radhouane	ISBS	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. En chef	HAMMAMI-BLIBECH Monia	CBS
Ass. App. Rech. Princ	Kameleddine Bouchaala	CBS

Docteurs (Postdoc)

Nom et prénom	Qualité	Etablissement
CHAKCHOUK-MTIBAA Ahlem	MOBIPOSTDOC Avril 2018 – Avril 2020	ANPR-Société VITALAG-LMB-CBS
KRIAA Mouna	MOBIPOSTDOC Janvier 2019-Janvier 2021	ANPR-Société Le BON GOÜT-LMB-CBS
TRABELSI-KANOUN Imen	MOBIPOSTDOC Janvier 2019-Janvier 2021	ANPR-Société S.T.P.P.A-LMB-CBS
SELLEM Imen	MOBIPOSTDOC Janvier 2019-Janvier 2021	ANPR-Société VITALAIT-LMB-CBS
BEN SLIMA Sirine	MOBIPOSTDOC Janvier 2019-Janvier 2021	ANPR-Société SOUAD GOURMANDISE-LMB-CBS
FARHAT-KHEMAKHEM Ameny	Post-doc	LMB-CBS
BOUKHRIS- CHOUAYEKH Ines	Post-doc	LMB-CBS

Doctorants

Nom et prénom
KAANICHE Fatma
BEN RHOUMA-ABBES Marwa
BEN NASR Yosri
CHOUIKHI Aicha
FOURATI-SAHNOUN Mariam

OBJECTIFS GENERAUX ET 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 pures, des extraits bioactifs et des 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 agro-ressources 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 ont été 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 2018.

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

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

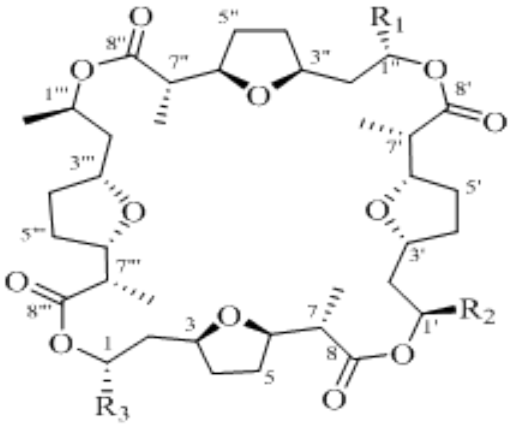
Personnel impliqué: Pr. Lotfi MELLOULI; Dr. Slim SMAOUI; Dr. Ahlem CHAKCHOUK-MTIBAA (MOBIPostdoc); Dr. Soumaya NAJAH-BEN YOUSSEF (Postdoc); Dr. Imen SELLEM (MOBIPostdoc); Mme Ines KARRAY-REBAI (Ing en. chef); Mr. Kameleddine BOUCHAALA (Ass. App. Rech.); Melle Fatma KAANICHE et Mme Mariam FOURATI-SAHNOUN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

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.

1. 1. Biomolécules de *Streptomyces*

Souche TN638:

- 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. TN638.
- 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 sept biomolécules pures à partir d'une fermentation de 15 litres de la souche *Streptomyces* sp. TN638.
- Caractérisation de la structure chimique de ces sept biomolécules pures ; **M1**: Cyclo-(Leu-Pro), **M2**: Cyclo-(Val-Pro), **M3**: Cyclo-(Phe-Pro), **M4**: Nonactin, **M5**: Monactin, **M6**: Dinactin et **M7**: Trinactin. La **Fig. 1**, illustre la formule chimique des composes **M4-M7**.
- La biomolecule pure **M7** possède une Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) contre le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* égale à celle de l'ampicilline.



	R1	R2	R3
M4	Me	Me	Me
M5	Me	Me	Et
M6	Et	Me	Et
M7	Et	Et	Et

Fig. 1. Structure chimique des composés **M4-M7**

Souche TN71:

Cette souche, isolée du sol saharien Tunisien, a été sélectionnée pour ses activités biologiques notamment contre les deux phytopathogènes *Agrobacterium tumefaciens* et *Fusarium oxysporum*. Elle a été identifiée par les techniques morphologiques et moléculaires comme étant une nouvelle bactérie *Streptomyces*. Plusieurs milieux de culture ont été testés et la production maximale des biomolécules a été observée sur le milieu liquide GYM. Afin d'optimiser la sécrétion des biomolécules par la souche de *Streptomyces* TN71 sur ce milieu de culture, nous avons appliqué le design expérimental de Plackett – Burman (PB) et le modèle de Box – Behnken (BB). Les réseaux de neurones artificiels (RNA) ont été également construits

pour prédire l'activité contre *Agrobacterium tumefaciens* et *Fusarium oxysporum.* La comparaison entre les résultats expérimentaux et prédits d'ANN et de la méthode des surfaces de réponses (MSR) a été étudiée. Le modèle ANN a révélé une amélioration de 12,36 % en termes de coefficients de détermination anti-*Agrobacterium tumefaciens* et anti-*Fusarium oxysporum*.

1. 2. Biomolécules de bactéries lactiques (bactériocines)

Nous avons poursuivi le programme de criblage de nouvelles bactéries lactiques (LAB) produisant des bactériocines ayant des activités biologiques notamment contre le phytopathogène le champignon *Verticillium dahliae* causant la verticilliose chez l'olivier. Plusieurs LAB ont été isolées à partir de différentes origines et certaines ont été sélectionnées pour leurs capacités d'inhiber la croissance du *V. dahliae* dont la souche YB1 (**Fig. 2**).

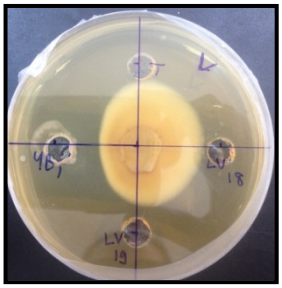


Fig. 2. Activité anti- *V. dahliae* du surnageant de la culture de la souche YB1.

Nous avons démontré que l'activité biologique observée est de nature protéique. La souche YB1 a été identifiée comme étant une nouvelle bactérie lactique du genre *Leuconostoc*. L'optimisation du milieu de culture ainsi que la purification et la caractérisation de la biomolécule (bactériocine BacYB1) sont en cours de réalisation.

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

Personnel impliqué: Pr. Hichem CHOUAYEKH ; Pr. Riadh BEN SALAH ; Dr. Ameny FARHAT-KHEMAKHEM (Postdoc); Dr. Ines BOUKHRIS (Postdoc); Mme Monia BLIBECH-HAMMAMI (Ingénieur en chef)

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. Les phytates représentent la forme majeure de stockage du P dans les céréales et sont considérés comme facteurs anti-nutritionnels qui chélatent les cations d'importance alimentaire majeure comme Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}… réduisant leur biodisponibilité.

2.1. Etude d'activités phytases chez des souches de *Bacillus thuringiensis*

Dans le cadre du présent travail, nous nous sommes focalisés sur l'étude des traits de promotion de la croissance des plantes chez *Bacillus thuringiensis*, une bactérie utilisée mondialement en tant qu'insecticide biologique et en biocontrôle. Plus précisément, nous avons mis l'accent pour la première fois sur l'étude d'activités phytases. Ainsi, nous avons criblé une collection de 86 souches de *B. thuringienis* (LB-CBS) ainsi que 4 souches nouvellement isolées (ND1, ND2, ND5, ND6) pour l'activité phytase. Cette étape a permis de sélectionner la souche ND6 possédant une activité phytase extracellulaire de l'ordre de 0,307 U/ml après 48 h. Afin d'identifier l'isolat ND6, nous avons amplifié par PCR le gène codant l'ARNr 16S. Ensuite,

nous avons amplifié pour la première fois à partir de souches de *B. thuringiensis*, un fragment de 864 pb interne au gène phytase de la souche ND6. Cette amplification a été obtenue avec l'ADN génomique mais pas avec l'ADN chromosomique révélant pour la première fois que l'activité phytase de *B. thuringiensis* est codée par un gène de nature plasmidique contrairement aux gènes phytases des autres espèces de *Bacillus* qui sont plutôt chromosomiques. Ceci a été supporté par l'analyse des séquences chromosomiques disponibles de *B. thuringiensis* révélant l'absence de gène phytase.

2.2. Etude de l'activité antibactérienne de l'acide phytique (substrat des phytases)

L'acide phytique (*myo*-inositol hexakisphosphate, IP6) est un composé naturel reconnu comme ''generally recognized as safe - GRAS''. Cette biomolécule a été souvent considérée comme facteur anti-nutritionnel en raison de ses effets négatifs sur l'absorption et la biodisponibilité des minéraux vitaux. Cependant, des études récentes ont illustré que cette molécule naturelle agit comme un composé empêchant plusieurs maladies/pathologies.

Dans le cadre de ce projet, nous avons investigué pour la première fois le potentiel antibactérien de l'IP6 pour le contrôle de la prolifération de bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*. L'IP6 a montré une activité inhibitrice significative ($P<0.05$) contrôle ces bactéries pathogènes d'origine alimentaire. La concentration minimale inhibitrice (CMI) varie de 0.488 à 0.97 mg/ml pour les bactéries à Gram-positif et est de 0.244 mg/ml pour les bactéries à Gram-négatif. Des modèles de type général/linéaire ont été introduits pour explorer cet effet antibactérien de l'IP6. Ces modèles développés ont été validés en utilisant les données expérimentales de la croissance de *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *S. typhimirium* sur leurs milieux sélectifs correspondants. En général, les modèles développés respectivement sur les milieux: PALCAM, Chapman broth et xylose lysine xeoxycholate (XLD) fournissent une authentification pour les prédictions de croissance de *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *S. typhimirium* **(Fig. 3)**. De manière particulièrement intéressante, sous l'effet des différentes concentrations testées de l'IP6, la phase de croissance logarithmique précoce de *S. typhimirium* a montré une décroissance rapide dans une période moins d'une heure.

Nos résultats renforcent les suggestions que l'IP6, un composé naturel, GRAS et biodégradable, pourrait être utilisé comme un candidat efficace et amical avec l'environnement pour le développement d'applications futures en industrie agroalimentaire soit comme un désinfectant pour décontaminer les équipements de transformation de produits alimentaires, ou bien comme agent bactéricide pour améliorer la sécurité microbiologique de produits alimentaires et prolonger par conséquent leur durée de vie.

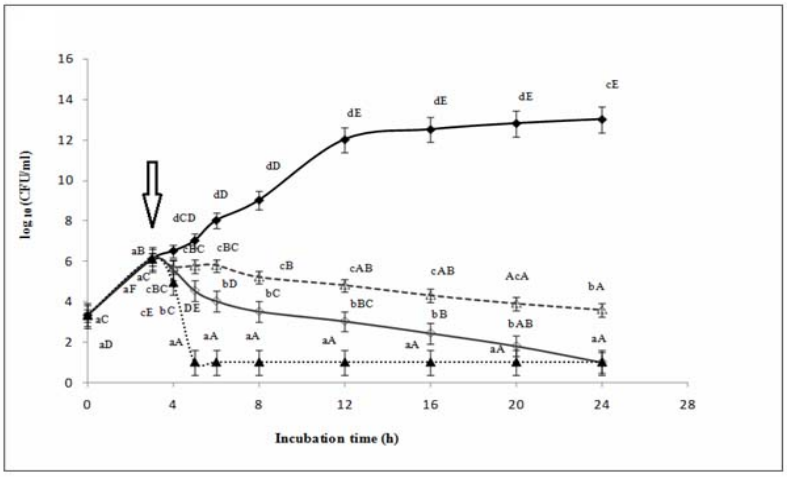


Fig. 3. Influence de l'addition de différentes doses d'IP6 sur la croissance de *L. monocytogenes* ATCC 19117 *in vitro* en utilisant un modèle linéaire (ANOVA). Compatge de cellules viables log_{10} (CFU/ml) en absence (Contrôle (◆)) et en présence de 1×MIC ( ), 2×MIC (◇) et 4×MIC (▲) of IP6. Le temps d'addition de l'IP6 (temps d'incubation 3 heures) est indiqué par une flèche.

II. 2.3. 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 réel 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 révélé que l'intestin provenant de poissons nourris avec *B. amyloliquefaciens* US573 contiendrait une microflore plus abondante dont la composition a été étudiée par séquençage à haut débit et est en cours d'analyse. 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. 2.4. Les enzymes mannanases

Les β-mannanases catalysent l'hydrolyse des liaisons β-1,4-mannosidiques dans la chaîne principale des mannanes, gluco et galactomannanes. Elles génèrent des manno-oligosaccharides et une petite quantité de mannose, glucose et galactose. Les mannanes sont des facteurs anti-nutritionnels: combinent souvent avec l'eau, augmentent la viscosité du chyme et bloquent partiellement la surface intestinale, ralentissant ainsi le temps de transit du digesta et réduisant donc le taux de conversion de l'aliment. Pour ceci, la β-mannanase est ajoutée pour digérer les mannanes, améliorer le taux de conversion de l'aliment et les performances de croissance.

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 2018, nous avons finalisé l'évaluation des propriétés probiotiques des cinq souches US134, US150, US176, US180 et US191 sélectionnées pour la production de β-mannanases extracellulaires. Ceci nous a permit de sélectionner la souche *Bacillus subtilis* US191 isolée d'un sol Tunisien et productrice d'une β-mannanase thermostable comme candidat prometteur pour application comme « direct-fed microbial » en alimentation animale. En effet, la souche US191 présente une activité inhibitrice importante contre de nombreux agents pathogènes bactériens d'origine alimentaire. Elle est également sensible à tous les antibiotiques testés et présente une bonne tolérance aux sels biliaires, ainsi qu'une grande capacité de formation de biofilm. Ces propriétés pourraient stimuler l'adhérence du probiotique aux cellules épithéliales intestinales ainsi que sa persistance. En outre, l'évaluation de la performance des cellules végétatives de la souche *Bacillus subtilis* US191vis-à-vis de la digestibilité du blé *in vitro* a révélé que US191 fait partie des souches présentant une efficacité élevée en matière de digestibilité de la matière sèche du blé par rapport à l'additif commercial, Rovabio® Max.

Projet 3 : Production et Formulation de biofilms bactériens en agroalimentaire (Responsable Pr. R. BEN SALAH)

***Personnel impliqué*:** Pr. Riadh BEN SALAH ; Pr. Hichem CHOUAYEKH ; Pr. Radhouane KAMMOUN ; Dr. Sondes KARRAY-CHOUAYEKH ; Dr. Imen TRABELSI-KANOUN (Postdoc); Dr. Sirine BEN SLIMA-KOLSI (Postdoc), Melle Aicha CHOUKHI (doctorante) et Mr. Kameleddine BOUCHAALA (Ass. App. Rech. Princ).

3.1. Optimisation de la concentration en conservateur chimique (nitrite) et de la concentration de la souche probiotique en vue de trouver la meilleure combinaison donnant une meilleure qualité des produits de charcuterie fermenté

Pour approfondir les recherches sur cet axe, il est important d'étudier l'effet de l'inoculation de la souche probiotique TN8 dans les produits de charcuterie fermentés en substituant une partie de la concentration en nitrites. A cet effet nous avons optimisé deux facteurs qui sont la concentration de nitrite ainsi que la concentration des souches probiotiques en vue de trouver la meilleure combinaison donnant une meilleure qualité de produits de charcuteries fermentés.

Finalement, nous avons analysé l'effet de la réduction de concentration du nitrite et l'inoculation par la souche *L. plantarum* TN8 sur la qualité microbiologique, la stabilité physico-chimique, et le profil textural des saucisses fraîches durant 10 jours du stockage à 4 °C. La réduction de la concentration du nitrite et l'ensemencement de la souche *L. plantarum*TN8 a un effet très bénéfique sur l'amélioration de la qualité microbiologique des saucisses fraîches durant son stockage à 4°C. En effet, l'incorporation de la souche probiotique TN8 possède un effet antimicrobien contre les pathogènes *L. monocytogenes* ATCC 19117 et *S. enterica* ATCC 14028 et l'application de cette souche est une méthode très efficace pour réduire la croissance de ces bactéries pathogènes par comparaison avec l'échantillon contrôle.

De plus, nous avons constaté que la réduction de la concentration du nitrite et l'ensemencement de la souche *L. plantarum* TN8 agit très positivement sur les caractéristiques physico-chimiques durant le stockage à 4°C des saucisses fraîches. En effet, la substitution du nitrite par la souche probiotique fait maintenir les valeurs de TBARS et les paramètres de la couleur, diminue les valeurs du pH et permet de garder la valeur nutritionnelle des saucisses fraîches. Egalement, les résultats obtenus ont montré que la présence de la souche probiotique TN8, améliore de façon très nette les paramètres texturaux des saucisses fraîches durant le stockage à 4°C. En effet, l'incorporation de la souche TN8 diminue l'élasticité et la masticabilité et la dureté des saucisses par rapport à l'échantillon contrôle.

3.2. Formulation à l'échelle laboratoire de la souche TN8 dans les produits de charcuterie

Nous avons essayé de substituer le rôle du sel de nitrite par la bactérie, *L. plantarum* TN8, dans le but d'assurer une meilleure conservation de la Merguez durant son stockage à 4 °C. Cette souche a été utilisée à deux concentrations (10^7 ou 10^8 UFC/g). Nous avons étudié l'effet de cette substitution dans la Merguez formulée au laboratoire sur les paramètres suivants:

***** La flore mésophile aérobie totale, la flore lactique, et les entérobactéries ;

*****Le suivi de la croissance des bactéries pathogènes: *L. monocytogenes* et *S. enterica* ;

***** L'analyse des caractéristiques physico-chimiques (pH, TBARS, couleur, teneurs en cendres, en matières sèches et en protéines) ;

***** L'évolution des paramètres texturaux.

Les résultats de ce travail ont montré que les saucisses fraîches préparées selon les différentes concentrations en nitrites et inoculées par la souche *L. plantarum* TN8 présentent des valeurs initiales de pH comprises entre 5,99 et 6,12 durant les 5 premiers jours de stockages. A la fin du stockage, on note une diminution du pH dans les produits ensemencés par la souche probiotique, ainsi que dans le contrôle. Cette diminution peut intervenir dans l'inhibition des microorganismes pathogènes, la formation d'oxyde de nitrite, l'amélioration de la saveur et la fermeté du produit. L'utilisation de la souche probiotique, *L. plantarum* TN8, conserve non seulement la valeur nutritionnelle des saucisses fraîches, mais favorise également des effets bénéfiques pour la santé des consommateurs lorsque les souches probiotiques sont administrées en quantités adéquates. Ainsi la détermination des propriétés physico-chimiques des saucisses

fraîches a montré que l'incorporation de la souche probiotique n'a aucun effet significatif sur les teneurs en humidité, en cendres et en protéines durant 10 jours du stockage à 4°C. Egalement, l'oxydation lipidique des produits carnés constitue la cause la plus importante de la détérioration de la qualité sensorielle et nutritionnelle, provoquant des changements irréversibles du goût, de la couleur, de l'odeur, de la flaveur et de la texture des produits carnés, ce qui tend à limiter leur durée de vie. L'oxydation lipidique a été évaluée sur les échantillons des saucisses fraîches, par la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et la valeur de TBARS est utilisée comme un indicateur de MDA. Ainsi nous avons démontrés que la réduction de la concentration du nitrite jusqu'à 50 ppm du nitrite et l'inoculation par la souche *L. plantarum* TN8 à 10^7 UFC/g n'a aucun effet sur les valeurs de TBARS des saucisses fraîches durant les 10 jours du stockage à 4°C.

L'analyse de la flore microbienne des saucisses fraîches nouvellement formulés montre que, la concentration de la FMAT est comprise entre $2{,}45.10^5$, et $1{,}69.10^6$ UFC/g durant les premiers jours de stockage. De plus, l'incorporation de la souche probiotique TN8 a un effet sur la croissance des BLs au cours de la conservation, A ce propos, il est à remarquer que pour les échantillons inoculés avec la souche probiotique TN8, assiste une augmentation du nombre des BLs par rapport au témoin et surtout pour les échantillons inoculés avec la souche TN8 à une concentration de 10^8 UFC/g

Dans la deuxième partie de ce travail et après évaluation de l'absence des souches pathogènes dans les saucisses fraîches, le but est d'évaluer l'efficacité de l'ajout de *L. plantarum* TN8 sur la croissance des deux souches pathogènes: *L. monocytogenes* ATCC 19117 et *S. enterica* ATCC 14028 qui ont été ajoutées à une concentration de 10^5 UFC/g dans les saucisses fraîches durant leur stockage à 4 °C. L'ajout de la souche probiotique TN8 à des concentrations de 10^7 ou 10^8 UFC/g réduit de manière significative ($P< 0{,}05$) la croissance de *L. monocytogenes* ($5{,}01.10^2$ et $1{,}99.10^3$ UFC/g, respectivement) et de *S. enterica* ATCC 14028 ($3{,}98.10^2$ et $5{,}01.10^2$ UFC/g, respectivement). Cette réduction peut être due à la formation de l'acide lactique, de l'acide propionique et de l'acide acétique. Ces acides jouent un rôle important dans la réduction de la croissance des souches pathogènes dans certains aliments fermentés. Egalement, les résultats obtenus ont montré que la présence de la souche probiotique TN8, améliore de façon très nette les paramètres texturaux des saucisses fraîches durant 10 jours de stockage à 4°C. En effet, l'incorporation de la souche TN8 diminue l'élasticité, la masticabilité et la dureté des saucisses mais n'a pas d'effet sur la cohésion et l'adhésion par rapport à l'échantillon contrôle. Ces résultats prouvent que l'utilisation de la souche probiotique TN8 durant le stockage à 4°C améliore de façon significative les paramètres texturaux des saucisses fraîches. Cette amélioration peut être due à la capacité des bactéries acido-lactiques de produire des enzymes qui peuvent diminuer l'élasticité des saucisses. Dans ce contexte, il est à signaler que les consommateurs préfèrent les produits à base de viande présentant une faible dureté, élasticité, cohésion et adhésion faciles à mâcher.

A la lumière de ces résultats, la réduction de la concentration de nitrite à 50 ppm et l'incorporation de la souche probiotique à 10^7 UFC/g et en tant que bio-préservative présentent une stratégie importante pour produire des saucisses fraîches bénéfiques pour la santé humaine.

Projet 4 : Valorisation des Agro-ressources par la voie microbienne (Responsable Pr. R. KAMMOUN)

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

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

Actuellement, la fermentation en milieu semi solide (SSF) a émergé comme une technique potentielle pour la valorisation des agro-ressources en vue de produire différentes biomolécules tels que les enzymes et les bio-fertilisants par des organismes mycéliens. En suivant la tendance et l'orientation vers l'économie durable, les bio-fertilisants peuvent conduire à une meilleure fertilité des sols, une amélioration dans la lutte biologique, une meilleure

résistance contre les stress abiotique, une augmentation du nombre des fruits et du rendement et enfin une réduction des coûts des produits agricoles.

Au cours de l'année 2018, nous nous sommes intéressés à sélectionner des souches productrices des enzymes (phosphatases) et d'une phytohormone (acide gibbérellique), de cribler et d'identifier la souche la plus performante, d'étudier la cinétique de production des phosphatases et de l'acide gibbérellique par fermentation en milieu liquide et en milieu semi solide à base des feuilles d'olivier. Dans ce cadre, deux souches B1 et B5 ont été criblées comme étant les souches les plus performantes pour la production de la phosphatase acide, phosphatase alcaline et de l'acide gibbérellique. La cinétique de production des enzymes et de l'acide gibbérellique a montré que la souche B1 a une meilleure production en comparaison avec la souche B5 en milieu liquide. Cette étude a montré aussi que la production des phosphatases dépend de la nature de source de phosphate dans le milieu de culture. L'étude préliminaire de la production de l'acide gibbérellique par fermentation en milieu liquide par la souche B1 a révélé qu'à un pH égale à 7, une taille d'inoculum 5% et une source de carbone sucrose la production de l'AG3 est maximale.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à valoriser les feuilles d'oliviers par voie microbienne afin de produire un bio-fertilisant. Ce dernier est constitué par des feuilles d'oliviers fermentées par la souche B1 à différents temps d'incubation additionnées ou non d'une application exogène par pulvérisation foliaire de l'acide gibbérellique (10^{-6} M) à partir d'un filtrat de la souche B1. Dans ce cadre, nous avons étudié l'effet de ce bio-fertilisant sur la croissance et la physiologie des plantes de tomates. Le traitement des plantes avec des feuilles d'olivier fermentées 15 jours supplémentés par une application exogène de l'AG3 montre une croissance optimale des plantes de tomates, ainsi que des teneurs en protéine plus élevées que celles du témoin. L'étude des caractéristiques physicochimiques du bio-fertilisant, tels que les composés phénoliques et les éléments minéraux est en cours. L'identification de cette souche B1, basée sur des critères morphologiques d'une part et sur les méthodes de biologie moléculaire par détermination de la séquence nucléotidique de la région ITS, d'autre part, ont permis d'identifier la souche B1 en tant qu'une sous espèce d'*Aspergillus Niger*.

Par ailleurs, nous avons entamé l'optimisation des conditions de production du bio-fertilisant le 3-indole acide acétique (l'auxine) par la souche K13 en milieu liquide moyennant la méthodologie facteur par facteur classique. La cinétique de production de la biomasse et de l'auxine montre que la production de l'auxine est associée à celle de la biomasse. Ainsi, la cinétique de production de l'auxine à différente concentration de biomasse (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5%) montre que le niveau de production est maximal (133,2 mg/l) à une taille d'inoculum de 1% après 360 heures de fermentation. De même, nous avons étudié l'effet de différente concentration de tryptophane (200, 300, 400 et 500 mg/l) sur la production de l'auxine. Les résultats obtenus montrent qu'en présence de 500 mg/l de tryptophane, la production est de l'ordre de 630,5 mg/l après 360 heures de fermentation. Elle augmente au cours du temps, après 408 heures de fermentation, elle atteint 672,96 et 662,13 mg/l à une concentration de tryptophane de 400 et 500 mg/l, respectivement. Par la suite, nous avons identifié l'auxine produit par la souche K13 par la technique HPLC. L'identification de la souche K13 est en cours de réalisation.

4.2. Production économique d'un complexe enzymatique par fermentation en milieu solide d'agro ressources et son application comme additif en nutrition animale

Dans le but d'améliorer les activités xylanase et cellulase, nous avons procédé à tester des prétraitements de la source de carbone (microonde, ultrason, acido-basique). Le meilleur rendement a été obtenu avec le prétraitement ultrason de 30 minutes à température ambiante. Pour l'activité xylanase le prétraitement a permis d'obtenir un rendement de 1132,5 U/gds soit une amélioration totale de 298,44 %, le maximum d'activité cellulase a été 183,7 U/gds soit une amélioration totale de 245,85 U/gds.

L'identification moléculaire suite à l'analyse de la séquence de la région 18S montre une homologie de 99,8% avec *Aspergillus niger*. Pour prouver d'avantage le résultat obtenu, l'amplification a été réalisée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche Y6 comme matrice et des amorces nucléotidiques universelles directes et reverses de la région ITS. Le

fragment amplifié obtenu possède une taille de 530 pb et présente une identité de 99,4 % avec *Aspergillus niger*.

Dans le but de tester l'impact de cocktail d'enzyme sur la croissance des poulets, l'évolution du poids corporel a été observé chez 3 lots de poulets qui sont respectivement, (A) lot de poulets traités par le cocktail d'enzyme commerciale (Rovabio), (B) lot de poulets traité par le cocktail d'enzyme synthétisé au laboratoire et (C) lot de poulets témoin. La consommation des aliments a été également observée pendant 76 jours. La masse corporelle des poulets du lot B est légèrement supérieure à celle du lot A mais dépasse visiblement la moyenne des masses corporelles du lot C.

Les poulets âgés de 91 jours ont été sacrifiés, des prélèvements de sang et d'organes (fois, reins et intestins) ont été établis afin d'évaluer le niveau de toxicité de l'aliment traité par le cocktail d'enzyme en observant les paramètres biochimiques. Des coupes histologiques HE, ont été réalisé sur les 3 organes précédemment mentionnés afin d'observer l'effet du cocktail d'enzyme sur le bienêtre de l'animal.

Par ailleurs et afin de choisir le substrat carboné le mieux adapté, nous avons testé plusieurs sources de carbones, (son du blé, bois d'olive, farine de graines de figue de barbarie et raquette de figue de barbarie) et nous avons mesuré leurs effets sur la production des enzymes par SSF en utilisant la souche Y3. Le choix de son du blé (SB) et le bois d'olive (BO) comme étant les substrats qui ont un effet positif sur la production de xylanase, β-xylosidase, α-L-arabinofuranosidase et β-xylosidase. La variation de rapport SB/BO a été testée pour l'optimisation de la production des enzymes, le rapport le plus adéquat pour la production de l'ensemble des enzymes est 60/40.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Comme nous l'avons détaillé projet par projet, 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. Par ailleurs, et pour valoriser les acquis de recherche des différents projets du Laboratoire de Microorganismes et de Biomolécules (LMB-CBS), nous avons proposé lors de l'appel MOBIDOC-POST-doctorants Session 2018 de l'Agence Nationale de la Promotion de la Recherche Scientifique (ANPR) quatre projets de recherche-développement en collaboration avec quatre industriels Tunisiens. Ces quatre propositions ont été retenues pour financement et ils ont démarré en Janvier 2019. Dans ce même cadre, nous avons également un autre projet MOBIDOC-POST doctorant en collaboration avec un cinquième industriel pour la session 2017 de l'ANPR. Ce projet est en cours de réalisation et il a démarré en Avril 2018. Avec cette ouverture sur le monde socio-économique, nous visons deux objectifs majeurs dont le premier en relation directe avec l'embauche des jeunes docteurs, et le deuxième, consiste à valoriser nos acquis de recherche et par conséquent contribuer de façon efficace au développement et l'amélioration des secteurs industriels et agricoles Tunisiens.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Publications parues en 2018

1. Imene Zendah El Euch, Marcel Frese, Norbert Sewald, Slim Smaoui, Mohamed Shaaban, **Lotfi Mellouli*** **(2018)**. Bioactive secondary metabolites from new terrestrial *Streptomyces* sp. TN82 strain: Isolation, structure elucidation and biological activity. ***Medicinal Chemistry Research.*** **V. 27, 1085-1092.** https://doi.org/10.1007/s00044-017-2130-4

2. Slim Smaoui, Karim Ennouri, Ahlem Chakchouk-Mtibaa, Imen Sellem, Kameleddine Bouchaala, Ines Karray-Rebai, Rayda Ben Ayed, Florence Mathieu, **Lotfi Mellouli*** **(2018)**. Modeling-based optimization approaches for the development of Anti- *Agrobacterium tumefaciens* activity using

Streptomyces sp TN71. ***Microbial Pathogenesis* 119. 19-27**. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.006

3. S. Smaoui , K. Ennouri, A. Chakchouk-Mtibaa, I. Sellem, K. Bouchaala, I. Karray-Rebai, **L. Mellouli*** **(2018).** Statistical versus artificial intelligence -based modeling for the optimization of antifungal activity against *Fusarium oxysporum* using *Streptomyces* sp. strain TN71. ***Journal of Mycologie Médicale 28 (2018) 551-560.*** https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.07.003

4. Ahlem Chakchouk-Mtibaa, Imen Sellem, Yosra Kamoun, Slim Smaoui, Ines Karray-Rebai, and **Lotfi Mellouli*** **(2018).** Safety Aspect of *Enterococcus faecium* FL31 Strain and Antibacterial Mechanism of Its Hydroxylated Bacteriocin BacFL31 against *Listeria monocytogenes* ***BioMed Research International*** Volume 2018, Article ID 5308464, 10 pages https://doi.org/10.1155/2018/5308464.

5. Imen Jaballi, Imen Sallem, Amal Feki, Boutheina Cherif, Choumous Kallel, Ons Boudawara, Kamel Jamoussi, **Lotfi Mellouli**, Moncef Nasri and Ibtissem Ben Amara **(2018)**. Polysaccharide from a Tunisian red seaweed *Chondrus canaliculatus*: Structural characteristics, antioxidant activity and *in vivo* hemato-nephroprotective properties on maneb induced toxicity. ***International Journal of Biological Macromolecules*** http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.048

6. Karim Ennouri · R. Ben Ayed · S. Ercisli · **S. Smaoui** · M. Gouiaa · M. A. Triki **(2018)**. Variability assessment in *Phoenix dactylifera* L. accessions based on morphological parameters and analytical methods. ***Acta Physiologiae Plantarum* 40:5** https://doi.org/10.1007/s11738-017-2583-6.

7. Olfa Ben Braïek, Stefano Morandi, Paola Cremonesi, **Slim Smaoui**, Khaled Hanif, Taoufik Ghrairi **(2018)**.
Biotechnological potential, probiotic and safety properties of newly isolated enterocin-producing Enterococcus lactis strains. ***LWT - Food Science and Technology* 92, 361-370**. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.045.

8. Bassem Khemakhem · **Slim Smaoui** · Hanen El Abed · Imen Fendri · Hajer Hammami · Mohamed Ali Ayadi **(2018)**. Improving changes in physical, sensory and texture properties of cake supplemented with purified amylase from fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. ***3 Biotech* 8:174** https://doi.org/10.1007/s13205-018-1197-z.

9. Olfa Ben Braïek, Stefano Morandi, Paola Cremonesi, **Slim Smaoui**, Khaled Hanif, Taoufik Ghrairi **(2018)**. Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic Enterococcus lactis strains isolated from raw shrimps. ***Microbial Pathogenesis* 117, 109-117.** DOI: 10.1016/j.micpath.2018.02.021.

10. Ben Braek Olfa, **Smaoui Slim**, Ennouri Karim, Hani Khaled, and Ghrairi Taoufik **(2018)**. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA of the Multiple Enterocin-Producing *Enterococcus lactis* 4CP3 Strain and Its Efficient Role in the Growth of *Listeria monocytogenes* in Raw Beef Meat. ***BioMed Research International*** Article ID 5827986.

11. Olfa Ben Braïek, Paola Cremonesi, Stefano Morandi, **Slim Smaoui**, Khaled Hani, Taoufik Ghrairi **(2018)**. Safety characterisation and inhibition of fungi and bacteria by a novel multiple enterocin-producing Enterococcus lactis 4CP3 strain. ***Microbial Pathogenesis* 118, 32-38.** DOI: 10.1016/j.micpath.2018.03.005.

12. Rayda Ben Ayed, Karim Ennouri, Sezai Ercişli, Hajer Ben Hlima, Mohsen Hanana, **Slim Smaoui**, Ahmed Rebai and Fabienne Moreau **(2018)**. First study of correlation between oleic acid content and SAD gene polymorphism in olive oil samples through statistical and bayesian modeling analyses. ***Lipids in Health and Disease* 17: 74**, https://doi.org/10.1186/s12944-018-0715-7**.**

13. Karim Ennouri1, Rayda Ben Ayed, **Slim Smaoui (2018).** Opportunities for computational biology uses in enhancement of bioproduct quality: Lessons from olive oil. ***Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30(7): 532-538.** doi: 10.9755/ejfa.2018.v30.i7.1736

14. Sirine Ben Slima, Naourez Ktari, Imen Trabelsi, Hafedh Mouss, Iskandar Makniand **Riadh Ben Salah** (**2018).** Purification, characterization and antioxidant properties of a novel polysaccharide extracted from *Sorghum bicolor* (L.) seeds in sausage. ***International Journal of Biological and Macromolecules* 106:** 168-178. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.010

15. Imen Trabelsi, Naourez Ktari, Mehdi Triki, Intidhar Bkhairia, Sirine Ben Slima, Sameh Sassi Aydi, Samir Aydi, Asehraou Abdeslam, **Riadh Ben salah**. **(2018)** Physicochemical, techno-functional, and antioxidant properties of a novel bacterial exopolysaccharide in cooked beef sausage. ***International Journal of Biological Macromolecules*.111**: 11-18. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.127

16. Sirine Ben Slima, Naourez Ktari, Imen Trabelsi, Mehdi Triki, Molka Feki-Tounsi, Hafedh Moussa, Iskandar Makni, Asehraou Abdeslam, Ana Herrero, Francisco Jimenez-Colmenero, Claudia Ruiz-Capillas Perez and **Riadh Ben Salah (2018).** Effects of probiotic strains, *Lactobacillus plantarum* TN8 and *Pediococcus acidilactici*, on microbiological and physico-chemical characteristics of beef sausages ***LWT Food Science and Technology*. 92:195-203**. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.038

17. Intidhar Bkhairia, Sana Bardaa, Naourez Ktari, Rihab Ben Abdallah Kolsi, Rim Kallel, Slim Zghal, **Riadh Ben Salah**, Moncef Nasri (**2018**). Gelatins from Liza aurata skin: Structural characterization, in vitro and in vivo validation of acceleration epithelialization and cyto-protective effects. ***Polymer Testing* 71 : 272-284.** https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.09.012

II/ Brevets

1. Nadia Bayar, **Lotfi Mellouli**, Radhouane Kammoun **(2018)**. Production d'antioxydants naturels par modification chimique de pectines de raquettes de figues de barbarie : extraction par ultrasons et thiolation. **INNORPI TUNISIE TN 2018/0101**.

2. SMAOUI Slim, CHAKCHOUK-MTIBAA Ahlem, SELLEM Imen, BLIBECH-HAMMAMI Monia, KARRAY-REBAI Ines, **MELLOULI Lotfi (2018)**. L'huile essentielle des feuilles de la plante aromatique Tunisienne de la région de Sfax *Mentha piperita* à faible dose (0,25 %), est un additif naturel efficace pour la préservation et l'amélioration des qualités microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles de la viande hachée de bœuf lors du stockage à 4°C. **INNORPI TUNISIE TN 2018/0140**.

3. KRIAA-JBARA Mouna, BEN RHOUMA-ABBES Marwa, **MELLOULI Lotfi**, KAMMOUN Radhouane **(2018)**. Effet bio-stimulant de la glucose oxydase d'Aspergillus tubingensis CTM 507 sur la germination des graines de blé et sur la croissance des plantes de blé. **INNORPI TUNISIE TN 2018/0208**.

4. SELLEM Imen, TRIKI Mohamed Ali, ELLEUCH Lobna, CHEFFI Manel, CHAKCHOUK-MTIBAA Ahlem, SMAOUI SLIM, **MELLOULI Lotfi (2018)**. Application du surnageant bioactif de la nouvelle souche de *Streptomyces* TN58 pour la lutte biologique contre le phytopathogène *Pythium ultimum*, agent causal de la pourriture aqueuse chez la pomme de terre. **INNORPI TUNISIE TN 2018/0250**.

FORMATION DIPLOMANTE

I/ Encadrements PFE pour l'obtention du diplôme d'Ingénieur :

1. DHOUIB Nesrine: Projet de fin d'études de l'école de Polytechnique de Sousse encadré par Pr. CHOUAYAKH Hichem: «Etude des traits de promotion de la croissance des plantes chez *Bacillus thuringiensis*» (Soutenu le 20 /006/2018).

2. DAABEK Hana: Projet de fin d'études de l'école de Polytechnique de Sousse encadré par Pr. MELLOULI Lotfi: «Bactériocines de nouvelles bactéries lactiques pour la lutte biologique contre *Verticillium dahliae*» (Soutenu le 26 /06/2018)

OUVERTURE SUR LE MONDE SOCIOECONOMIQUE

Cinq conventions de Recherche-développement avec cinq Industriels Tunisiens et ce dans le cadre des appels MOBIDOC-POST-doctorants Sessions 2017 et 2018 de l'Agence Nationale de la Promotion de la Recherche Scientifique (ANPR).

1/ MOBIDOC-POSTDOC 1 :entre le LMB-CBS (docteur Ahlem CHAKCHOIK MTIBAA) et la Société Industriel VITALAG; ***intitulé*** «Développement d'un nouveau produit naturel à base d'engrais organique (Humivital) et de bactériocines (peptides antimicrobiens) à base de bactéries lactiques pour la nutrition et la protection des oliviers».

2/ MOBIDOC-POSTDOC 2 : entre le LMB-CBS (Dr. Imen SELLEM) et la Centrale Laitière de Mahdia VITALAIT; ***intitulé*** «Etude microbiologique, biochimique et physico-chimique de l'instabilité du lait UHT de la marque VITALAIT et installation d'un modèle prédictif de contrôle»

3/MOBIDOC-POSTDOC 3 : entre le LMB-CBS (Dr. Imen TRABELSI) et la société Tunisienne de Production des Produits Alimentaires STPPA; ***intitulé*** «Fabrication de nouvelles gammes de cafés aromatisés et à base de noyaux de dattes»

4/MOBIDOC-POSTDOC 4 :entre le LMB-CBS (Dr. Mouna KRIAA) et la Société Industrielle le Bon Gout; ***intitulé*** «Incorporation de l'enzyme glucose oxydase comme un antioxydant et un conservateur dans les produits céréales et étude de son effet sur les propriétés rhéologiques et texturales des produits fabriqués»

5/MOBIDOC-POSTDOC5 : entre le LMB-CBS (Dr. Sirine BEN SLIMA) et la Société Industrielle Souad Gourmandise; intitulé «Incorporation des polysaccharides et des probiotiques dans la crème et les produits de pâtisserie : Effet sur la qualité des produits reformulés»

.

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

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Prénom et NOM	Grade	Institution
Samir BEJAR	Professeur	CBS
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	FSS
Dorra AYADI-ZOUARI	Maître Assistante	FSS
Fakher FRIKHA	Maître Assistant	FSS
Fakher KAMOUN	Maître Assistant	ISBAM
Mehdi EL ARBI	Maître Assistant	ISBS
Mouna SAHNOUN	Post-Doc	CBS
Manel BEN ALI	Post-Doc	CBS
Fatma EL GHARBI	Post-Doc	CBS
Wassim BEJAR	Post-Doc	CBS
Mouna BEN ELHOUL	Post-Doc	CBS
Rihab AMERI	Post-Doc	CBS
Hatem REKIK	Post-Doc	CBS
Lobna DAOUED	Post-Doc	CBS
Monia MEZGHANI-ABID	Technicien en Chef	CBS
Adel HADJ IBRAHIM	Technicien	CBS
Sahar TRABELSI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
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 SALEM	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Asmahen AKREMI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS

OBJECTIFS GENERAUX ET SPECIFIQUES

Notre laboratoire a pour objectif de mettre à la disposition du secteur économique des souches et des enzymes microbiennes d'intérêt industriel ainsi que des procédés de production et d'application de ces enzymes et souches. Les enzymes peuvent être obtenues à partir de nouveaux microorganismes ou à partir du métagénome fécal du dromadaire. Le criblage de ces enzymes est suivi par une étude approfondie de leurs propriétés biochimiques, moléculaires et structurales. En cas de besoin, une amélioration des performances de ces enzymes est entreprise, afin de mieux les adapter aux conditions d'applications industrielles. L'optimisation des conditions de production de certaines de ces enzymes les plus adéquates ainsi que leurs formulations et leurs tests dans des applications industrielles sont les objectifs finaux de nos travaux. Les enzymes et les souches ciblées par nos études trouvent leurs applications en agroalimentaire en tannerie et dans les détergences. Sur un autre plan, un projet sur la lutte contre le feu bactérien est développé visant la recherche de phages ou d'enzymes susceptibles d'être utilisés pour lutter contre *Erwinia amylovora*, l'agent pathogène causale du feu bactérien.

LISTE DES PROJETS

Les travaux du LBMIE sont répartis en trois projets et les résultats obtenus au cours de l'année 2018 sont présentés suivant ces trois projets.

1/ **Projet1 :** Enzymes pour des additifs et des procédés en Agro-alimentaire: approches classique et métagénomique **(**Prof. Samir Bejar & Dr Aïda Hmida-Sayari)
2/ **Projet 2** : Enzymes d'intérêt industriel pour la détergence et la tannerie (Dr Bassem JAOUADI)
3/ **Projet 3** : Ciblage enzymatique, microbien et biochimique du pouvoir pathogène d'*Erwinia amylovora* (Pr Mamdouh Ben Ali)

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Projet 1: Enzymes pour des additifs et des procédés en Agro-alimentaire: approches classique et métagénomique (Responsables : Pr S. BEJAR & Dr A. 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 entrepris en 2018 concernent, le criblage, l'étude, l'amélioration et l'application de quelques enzymes destinées à la panification, l'alimentation animale et la production de sucres à haut pouvoir sucrant et faible pouvoir calorifique.

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

a) Relations structure-fonctions de la xylanase de la souche Aspergillus niger *US368*

Dans un travail antérieur une endoxylanase nommée *XAn11*, produite par la souche *Aspergillus niger* US368, a été purifiée et caractérisée. Le gène codant la XAn11 a été cloné et exprimé dans *E. coli* et dans *Pichia pastoris*. Les résultats ont montré que l'activité de l'enzyme recombinante exprimée dans *E. coli* a été améliorée de 54% en présence de 3 mM de Cu^{2+} alors que celle de la xylanase exprimée dans *P. pastoris* (ainsi que l'enzyme sauvage) est inhibée dans les mêmes conditions. La modélisation moléculaire suggère que la région de contact entre le site catalytique et le peptide His-tag N-terminal apporté par le vecteur forme une sorte de poche qui pourrait être responsable de la différence de comportement de l'enzyme native et recombinante envers le cuivre. Au cours de l'année 2018, le gène a été amplifié en utilisant le plasmide recombinant pET28a(+)-XAn11. Deux formes de xylanases recombinantes ont été obtenues une qui est taguée des deux cotés NH_2 et COOH terminales et l'autre forme est taguée seulement du coté NH_2 terminale. Les résultats ont révélé que les deux xylanases recombinantes présentaient des comportements différents envers le cuivre. En présence de 3 mM de Cu^{2+}, l'activité relative de la xylanase recombinante taguée seulement du coté NH_2 a été améliorée d'environ 52%. Cependant, la xylanase recombinante taguée des deux cotés NH_2 et COOH terminales est fortement inhibée en présence du cuivre. L'enzyme recombinante taguée seulement du coté NH_2 est plus thermostable, en présence de 3 mM de Cu^{2+}, que celle doublement taguée avec un temps de demi-vie de 10 min à 60 °C. Des modèles 3D des deux formes recombinantes ont été construits. Les résultats ont montré que le site de cuivre créé dans la protéine taguée seulement du coté NH_2 a été délété dans la protéine doublement taguée en raison de la fluctuation élevée et probablement de nouvelles interactions entre les acides aminés C et N-terminaux.

b) Purification, caractérisation d'une nouvelle xylanase de Bacillus pumilus *US570*

Une nouvelle souche nommée US570 a été isolée à partir d'un échantillon d'orge contaminé. Elle a été identifiée en tant que *B. pumilus* US570 moyennant des approches moléculaires. L'activité xylanase maximale, obtenue après 40 h de culture de la souche *B. pumilus* US570 sur milieu LB liquide contenant 2% de son de blé, est d'environ 70 U/mL. La xylanase produite par cette souche (XylUS570) a été purifiée et la caractérisation biochimique a révélé des optima de températures et de pH respectivement de 55 °C et 7. La taille de l'enzyme purifiée a été estimée

à 232 kDa. A notre connaissance il s'agit de la masse moléculaire la plus élevée d'une xylanase monomérique produite par une souche bactérienne. Le temps de demi-vie de la XylUS570 est de 10 min à 60 °C. A 37 °C, l'enzyme conserve plus de 50% de son activité à un pH compris entre 6 et 9,5 pendant 24 h. La XylUS570 présente une activité élevée sur les substrats xylanolytiques, cependant, aucune activité n'a été détectée sur les substrats cellulosiques. Cette enzyme pourrait constituer un puissant candidat pour le prétraitement des pâtes dans l'industrie papetière.

c) Optimisation de la production, purification et caractérisation biochimique de l'activité amylase de la souche **Bacillus subtilis** *US572*

Dans un travail antérieur, une amylase (AmyKS) a été purifiée et caractérisée à partir d'une nouvelle souche de *B. subtilis* US572. L'Analyse de la masse moléculaire montre que AmyKS est une protéine dimerique. Le gène codant cette enzyme a été isolé (2036 pb), il code pour une protéine de 685aa. En 2018, une modélisation moléculaire de l'AmyKS a été réalisée en se basant sur la structure cristalline de l'α-amylase de *B. subtilis* (PDB: 1bag.1.A). L'examen des différents models établis (monomère et dimère) a permis de donner des explications d'une part sur la structure dimérique de notre enzyme et d'autre part sur sa grande affinité vis-à-vis du substrat. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article soumis pour publication. Par ailleurs, le gène codant l'amylase AmyKS a été exprimé chez *E .coli*. Deux variantes du gène ont été étudiées: la première avec un peptide signal (SPS+) et la deuxième sans peptide signal (SPS-). Noter étude montre que le gène (SPS-) donne une activité plus élevée que celui du gène (SPS+). En effet, le dosage de l'activité amylolytique dans l'extrait cellulaire, chez BL21-Amy-(SPS-), a montré une activité maximale de 900U/ml. L'enzyme recombinante Amy-(SPS-) taguée du coté C-ter (His6) a été purifiée en une seule étape en utilisant une colonne de chromatographie d'affinité Ni-NTA. La comparaison entre Amy-(SPS-) et le type sauvage AmyKS a montré des différences dans certaines caractéristiques biochimiques. Une étude structurale par modélisation moléculaire a été entamée afin de prouver l'implication de la queue His-tag dans cette variation des caractéristiques biochimiques. L'ensemble des travaux réalisé sur les recombinants AmyKS (SPS-, SPS+) fait l'objet d'un article en préparation.

d) Etude cristallographique de la xylanase XAn11 et de l'amylase AmyKS

Dans un autre volet de ce travail, nous nous sommes intéressés à la cristallisation de l'amylase AmyKS et la xylanase XAN11 (Elgharbi et *al*., 2015) afin de mieux comprendre la relation structure-fonction de chaque enzyme. Ce travail a été réalisé dans un laboratoire de Biocristallographie en Italie. La première étape de la cristallisation, était l'obtention d'une enzyme pure en grande quantité moyennant deux étapes de purification: La chromatographie d'affinité Ni-NTA et la chromatographie de gel de filtration G75. La technique de cristallisation utilisée est celle de la diffusion de vapeur en goutte suspendue. Après une optimisation des différents paramètres: la concentration de l'échantillon, le pH du tampon, la nature de l'agent précipitant et la température des cristaux protéiques ont été obtenus. La diffraction de rayon X et la collecte des données ont été réalisées au Synchrotron européen de Grenoble. Afin de traiter les images enregistrées lors de la rotation du cristal, une série des programmes informatiques a été utilisée. Les structures de la xylanase et de l'amylase, ont été déterminées avec une résolution de 1.7 Å et 2.5 Å respectivement.

2- Amylases améliorants de panification

*a) Souche S2 d'*Aspergillus oryzae

Nous avions isolé une souche dite *A. oryzae* S2 productrice d'amylases qui produit en milieu liquide 4 isoformes, AmyA, AmyB, AmyB1 et AmyB2. Une troisième forme dite AmyC est également détectée en fermentation semi-solide. Par ailleurs, nous avons cloné le gène codant AmyA et montré qu'elle renferme 8 introns et 9 exons codant pour une protéine de 500 acides aminés. Nous avons également caractérisé la forme tétramérique de l'isoforme AmyC et exprimé le gène codant dans le système hétérologue *P. pastoris*. Au cours de l'année 2018 nous avons purifié l'amylase recombinante r-AmyA sur colonne de Nickel. L'amylase recombinante purifiée présente une thermostabilité plus importante que l'amylase sauvage. Ceci pourrait être dû à la présence d'un site de N-glycosylation dans le motif NYS197-199. L'étude de l'effet des ions métalliques sur l'activité de la r-AmyA a montré que les ions Mg^{2+} et Fe^{2+} sont des activateurs de la r-AmyA, bien qu'ils soient des inhibiteurs de l'enzyme native. L'étude *in-silico* a prouvé ces nouvelles caractéristiques de l'enzyme recombinante exprimée dans le système *P. pastoris.* Ce travail a abouti à 2 articles en 2018 publiés.

b) Amylase de la souche US586 de Bacillus subtilis

Dans un travail antérieur, trois isoformes d'amylase, produites par la souche *B. subtilis* US586 ont été purifiés et caractérisés. Ces isoformes sont stables à des pH acides et présentent une thermostabilité modérée et génère le maltose, le maltotriose et le maltopentaose à partir de l'amidon ce qui la rend prometteuse pour une application en panification. En 2018, nous avons étudié l'effet d'Amy586 sur les propriétés rhéologiques de la pâte. Son action indique que le rapport entre l'élasticité et l'extensibilité de la pâte avait diminué indiquant que cette farine est appropriée pour la fabrication du pain. Il a également été observé que la pâte supplémentée en Amy586 à raison de 0,06 U/g de farine augmente significativement la force boulangère par rapport au contrôle. Pour l'aspect du pain, nous avons remarqué une amélioration de la couleur de la croute, une diminution de la dureté du pain et une augmentation de la cohésion et de l'élasticité. Ce travail a abouti à un article publié.

c) Xylanase de la souche Caldicoprobacter algeriensis

La séquence génomique partielle suivit de l'annotation de la souche *Caldicoprobacter algeriensis* sp. nov. TH7C1^T thermophile et anaérobie a révélé la présence d'un gène codant une xylanase appelée xynBCA. Le gène de xynBCA code pour un polypeptide de 451 aa ayant une masse moléculaire calculée de 51758,59 Da. L'analyse de la séquence montre qu'elle appartient à la famille 10 des glycosides hydrolases. Ce gène a été exprimé dans *E. coli* et l'enzyme a été purifiée à homogénéité. La caractérisation a montré des optima de température et de pH de 80 °C et 6,5 respectivement. L'enzyme est thermostable puisqu'elle retient toute son activité après 2h d'incubation à 75 °C et son demi- vie est de 20 min à 80 °C. La XynBCA a été utilisée comme additif dans la détergence et testée pour le blanchissement du carton. Un article sur ce sujet est en cours de préparation.

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

Le D-fructose et le D-Tagatose se caractérisent par leur pouvoir sucrant élevée et leur pouvoir calorique faible. En 2018 nous avons notamment poursuivit l'étude et la mise en œuvre du glucose isomérase de la souche thermophile *Caldicoprobacter algeriensis* sp. TH7C1^T pour la production de sirop de fructose sirop à haute teneur en fructose (HFS).

Glucose isomearse de la souche thermophile Caldicoprobacter algeriensis *: Caractérisation et application pour la production de sirop de Fructose.*

Dans un travail antérieur nous avons cloné et exprimé une glucose isomérase (GICA) à partir de

cette souche après séquençage partielle de son génome. La caractérisation de la GISK a révélé qu'elle est thermoactive (T_{op}= 90°C), thermostable et surtout ayant une activité spécifique la plus élevée jamais enregistrée pour des GIs de la même famille. En 2018, nous sommes intéressés à immobiliser la GICA afin de réduire le coût de l'enzyme à l'échelle industrielle. Cette étude, réalisée en partie en collaboration avec laboratoire de l'Institut de catalyse et pétrochimie (Espagne) a montré que le sepabeads EC-HA est choisie comme étant le support le plus adéquat pour l'immobilisation. Il a révélé aussi que la température et le pH optimaux de la GICA immobilisé sont similaires à celles de l'enzyme libre. Néanmoins, l'enzyme adsorbée présente une activité relative plus élevée au pH acide, une stabilité thermique supérieure et une bonne stabilité de stockage par rapport au l'enzyme libre. De plus, l'enzyme immobilisée a montré une excellente stabilité opérationnelle dans un réacteur discontinu vu qu'elle préserve 83% de son activité initiale après 15 cycles successifs de réaction de 3h à 85 °C. De plus, un processus continu de production de sirop à haute teneur en fructose (HFS) a été mis en place avec la GICA adsorbé pendant 11 jours à 70 ° C, ce qui a permis d'obtenir un taux de bioconversion maximal de 49% après 48h d'opération. Ce travail a généré un article publié, un brevet national et un article en préparation.

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

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 14000 clones à haut débit pour leur potentiel à dégrader les fibres alimentaires. Quelques clones positifs ont été séquencés par le NGS (Illumina Miseq du CBS). L'annotation taxonomique et fonctionnelle de ces séquences a permis d'identifier plusieurs gènes codants pour des activités fibrolytiques et d'étudier 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. Nous avons également exprimé quelques gènes révélés après l'analyse de la séquence de quelques clones. Ainsi nous avons exprimé une nouvelleglycoside hydrolase appartenant à la famille GH26 et deux peroxydases à thiols non hémiques: TP24p15 et TP24p15 d'autre part. Leurs optima de pH et de température sont de 10 et 70°C pour la TP24p15 contre 4,5 et 50°C pour la TP37m5. Ces deux peroxydases sont actives pourraient être des candidates pour l'alimentation animale et pour la dégradation des lignocelluloses. Au cours de l'année 2018, nous avons cloné et exprimé une estérase appartenant à la famille CE7 des Carbohydrates Estérases. Le gène codant une estérase de la famille CE7 des Carbohydrates estérases appartenant au clone 26H3 et de taille d'environ 1233 pb a été cloné dans un vecteur d'expression. La caractérisation préliminaire de l'estérase taguée dans l'extrait brut a révélé qu'elle est active à des pH alcalin (> 10). Ceci est très encouragent quant à l'application de cette enzyme dans plusieurs domaines d'application biotechnologique. Ce travail a généré un brevet et un article en cours de rédaction.

Projet 2: Enzymes d'intérêt industriel pour la détergence et la tannerie (Responsable : Dr B. JAOUADI)

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, Dr Daoud L & Dr Ben Elhoul M
Doctorants mobilisés : Omrane Benmrad M, Mechri S, Hamdi S & Jabeur F.
Ce projet s'articule autour de deux thématiques d'enzymes microbiennes notamment les

hydrolases et les oxydoréductases d'intérêts industrielles et environnementales.

1- Les hydrolases bactériennes d'intérêts industrielles

Les hydrolases notamment les peptidases ou 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) Deux nouvelles peptidases SAPN et SAPV ayant un intérêt écologique potentiel

Deux nouvelles peptidases nommées SAPN et SAPV secrétées respectivement à partir de la souche Nari2A^T de *Melghiribacillus thermohalophilus* gen. nov.,sp. nov. isolée à partir de chott Melghir en Algérieetla souche FarD^{T}de *Virgibacillus natechei* sp., nov, isolée à partir de la sebkha de Taghiten sud-ouest en Algérie ont été purifiées et caractérisées. La production, à l'échelle Erlenmeyer, est optimale de 15800 U/mL à 55 °C après 52 h de culture pour SAPN et 16000 U/mL à 35 °C après 36 h de culture pour SAPV.Les techniques de purification utilisées dans ce travail, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène ayant des masses moléculaires de 30 kDa (SAPN) et 31 kDa (SAPV) déterminées par SDS-PAGE et HPLC. Leur pureté a été également vérifiée par le séquençage de leur extrémité NH_2-terminales, qui montrent une forte homologie avec les peptidases à sérine du *Bacillus*. L'optimum de l'activité protéase de SAPN est obtenu à pH 10 et à 75 °C contre pH 9 et à 60 °C pour SAPV. Les deux enzymes se distinguent par une large spécificité vis-à-vis des substrats protéiques et elle est douée d'une meilleure efficacité catalytique et degré d'hydrolyse sur les farines des coproduits de crabe et de crevette (pour la SAPN) en comparaison avec les enzymes ainsi que les protéases commerciales et purifiées SAPA, SPVP, Flavourzyme 500 L, Alcalase Ultra 2.5L, Pepsine, Trypsine, Papaine et Subtilisine 309. Ils présentent également une stabilité remarquable en présence des osmolytes (100 et 73% pour SAPN et 62 et 52% pour SAPV) en présence respectivement de 5 M NaCl et KCl. La SAPN montre ainsi une capacité de déprotéinisation intéressante des coproduits de crabe bleus « *Portunussegnis* » et de crevette blanches « *Metapenaeus monoceros*» pour la récupération d'une chitine de bonne qualité similaire à la chitine commerciale. La protéase SAPV présente une stabilité et compatibilité remarquable avec les détergents liquides et solides (EcoVax, Dipex, Det, Ariel, Nadhif, OMO, Dixan, Skip, Class et iSiS) par rapport aux enzymes commerciales Alcalase Ultra 2,5 et Savinase 16L, type EX, Egalement l'ajout de la protéase SAPV à la solution détergente améliore les performances du détergent Class dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du sang, du chocolat et du jaune d'œuf. Par ailleurs, les gènes *sapN* et *sapV* codant les peptidases SAPN et SAPV ont été clonés, séquencés et exprimés chez *E. coli*. Les protéines recombinantes (rSAPN et rSAPV) s'exprimant chez *E. coli* BL21(DE3)pLysS dans l'espace extracellulaire (8000 et 7000 U/mL), possèdent des caractéristiques identiques à celles trouvées pour les protéines natives. En conclusion, les peptidases semblent répondre à la majorité des propriétés de bonnes enzymes d'intérêt industriels et écologiques notamment la SAPN pour la déproteinisation des coproduits des crustacés essentiellement ceux de *Portunus segnis* et *Metapenaeus monoceros* qui sont deux espèces exogènes dans les cotes tunisiens et la SAPV pour la formulation des détergents de lavage et pour la synthèse peptidique.

b) Développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de reverdissage et épilage-pelanage enzymatiques pour le traitement des cuirs

Les extraits enzymatiques de fermentation des souches CBS de *B. pumilus*, RH12 de *B. safensis*, pNZ9 de *Bacillus subtilis* DB430 productrices, respectivement des protéases SAPB, SAPRH et SAPB-N99Y ainsi que les extraits des souches DZ50 d'*Actinomadura viridilutea* et US575 de

Brevibacillus brevis et Q7 de *B. tequilensis* productrices, respectivement des kératinases KERDZ, KERUS et KERQ7 ont été tester pour le traitement des cuirs à l'échelle laboratoire et pilote. Les testes montrent que les extraits formulés des enzymes SAPRH et KERDZ sont les meilleurs et pourra être utilisée avec succès respectivement dans l'opération de reverdissage et d'épilage enzymatique lors de traitement des cuirs.

2- Les oxydoréductases fongiques d'intérêts biotechnologiques et environnementales

La voie des enzymes lignolytiques concerne les champignons ligninolytiques (c'est à dire ayant l'aptitude à dégrader la lignine) qui appartiennent à la classe des Basidiomycètes, encore appelés « champignons de la pourriture blanche » (ou «white-Rot-Fungi»), en raison de l'aspect blanchâtre du résidu de dégradation de la lignine suite à leur attaque. Nous nous sommes donc intéressés dans ce travail à la sélection des souches fongiques productrices d'activité peroxydase. Ainsi, les peroxydases purifiées, issues des deux champignons la souche CTM10101 de *Tramatescingulata* et la souche CTM10002 d'*Aspergillus niger*, présentent des masses moléculaires d'environ 41 et 30 kDa, respectivement, estimées sur gel SDS-PAGE et HPLC. Leur pureté a été également vérifiée par le séquençage de leur extrémité NH_2-terminales, qui montrent une forte homologie avec les peroxydases fongiques. Il s'agit de deux peroxydases hémiques du fait qu'elles sont totalement inhibées par le cyanure de potassium (KCN) et l'azoture de sodium (NaN_3). Les optima de pH et de température sont de 9 et 80 °C pour la LiP TC41 contre 5 et 40 °C pour la MnP AN30. La thermostabilité de ces deux peroxydases est améliorée en présence du magnésium à une concentration de 1 mM pour la LiP TC41 et en présence de manganèse à une concentration de 1 mM pour la MnP AN30. Ces deux peroxydases sont actives sur une large gamme de substrats phénoliques (2,4-DCP et 2,6-DMP). Ainsi, les deux enzymes pourraient être des candidates potentielles pour la détergence et la dégradation des colorants textiles.

En 2018, ce travail a abouti à la publication de 5 articles et de 5 chapitres d'ouvrage scientifique ainsi que 2 brevets d'invention INNORPI. En plus du renouvellement du projet tuniso-algérien code TA/04/2012 (2012-2018) et du projet PNRI dégraissage-reverdissage entre LBMIE-CBS/CNCC/LBGEL-ENIS et la société SO.SA.CUIR (2016-2019) et la signature, le 13/11/2018, d'une convention de recherche collaborative entre le LBMIE-CBS et la société de détergence EJM.

Projet 3: Ciblage enzymatique, microbien et biochimique du pouvoir pathogène d'*Erwinia amylovora* (Responsable : Pr M. BEN ALI)

Chercheurs impliquées: Dr M. El Arbi, Dr Hmida-Sayari, Dr M. Ben Ali, Dr L. Daoud, Dr H. Hmani et Dr Rania Ghorbel.
Doctorants mobilisés:A. Hadj Brahim, F. Abdmouleh, A. Akremi et Abdallah Hammadi (remplacé par Wided BRABRA)

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 contrôler *Erwinia amylovora*. La lutte biologique avec des bactériophages commence à 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, des bactériophages d'*Erwina* qui évoluent dans notre écosystème. 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 des souches résistantes aux agents antibactériens et aux facteurs environnementaux. Ce projet vient de commencer avec le nouveau contrat programme du LBMIE les résultats sont encore préliminaires. Cependant, au cours de 2017-2018, nous avons obtenu les résultats suivants :

- ✓ Isolement et identification de six souches différentes d'*Erwinia mylovora* (Ea, Er4, Er7, Erwinia, Eaw, EaJd) issues de différentes régions de la Tunisie et Caractérisation de ces souches avec différents méthodes tel que la résistance aux antibiotiques, l'activité antibactériennes et antagonisme, les polysaccharides de la capside et par les phages
- ✓ Isolement de neuf souches (Ep1-Ep10) épiphytes et endophytes, antagonistes à *Erwinia amylovora*. Les souches antagonistes ont été testées sur boîtes et en culture liquide, les résultats sont fort encourageants et ils affichent une forte activité d'inhibition contre *Erwinia amylovora*.
- ✓ Isolement et purifications de 72 bactériophages d'*Erwinia amylovora* différents à partir du sol et du matériel végétal des Poiriers de différentes régions de la Tunisie.
- ✓ Test de l'efficacité des bactériophages *in vivo* sur les fruits (pomme) et les feuilles du Tabacs : Résultats concluants.
- ✓ Des essais de sélection et de formulation de phage résistants aux conditions extrêmes (Température, pH, UV…) réalisé en collaboration avec la Startup Astrum Biotech. Ainsi, à partir de différents phages sélectionnés pour leurs stabilités, nous avons préparé 10 cocktails différents (5 phages par cocktail) et l'étude de la stabilité est en cours depuis 5 mois à différentes conditions de température de stockages.
- ✓ Initiation du séquençage génomique et de l'identification morphologique par microscopie électronique en collaboration avec le Pr Nacer Feto du groupe OMICS du Département de Biotechnologie de la « Faculty of Applied & Computer Sciences of Vanderbijlpark » de l'Afrique du sud.

Nous avons aussi progressé dans la recherche de nouvelles molécules à base de composés organométalliques dérivés du ferrocène bioactifs contre *E amylovora*. Ce travail a été en collaborations avec Pascal Pigeon de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (CNRS). Ainsi, nous avons réalisé une série de synthèses et de criblage de nouvelles molécules dérivé du ferrocène.

Dans le même sens et Dans le cadre du projet PHC-UTIQUE, nous avons lancé un programme de développement de nouvelles molécules antibactériennes analogues au bisacodyl et de travailler sur l'optimisation de leurs activité. Les résultats obtenus montrent le fort potentiel d'une dizaines de nouvelles molécules qui peuvent être présenté comme une alternative aux antibiotiques, interdit pour le traitement de *E amylovora* encapsulé.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

1- Publications parues en 2018 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture et à IF

1. **Sahnoun M, Jemli S, Trabelsi S et Bejar S (2018)** Modifing *Aspergillus oryzae* S2 amylase substrate specificity and thermostability through its tetramerisation using biochemical and in silico studies and stabilization. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 117:483-492.
2. **Sahnoun M, Saibi W, Brini F et Bejar S(2018)** Apigenin isolated from *A. americana* encodes Human and *Aspergillus oryzae* S2 α-amylase inhibitions: credible approach for antifungal and antidiabetictherapies. ***J. Food Sci. Technol.*** 55(4):1489-1498.
3. **Ameri R, Laville E, Potocki-Véronèse G, Trabelsi S, Mezghani M, Elgharbi F, Bejar S (2018)**Two new gene clusters involved in the degradation of plant cell wall from the fecal microbiota of Tunisian dromedary. **PLoS One. 13(3) e0194621.**
4. **Bedade D, Deska J, Bankar S, Bejar S, Singhal R et Shamekh S (2018)** Fermentative production of extracellular amylase from novel amylase producer, *Tuber maculatum* mycelium, and its characterization. ***Prep. Biochem. Biotechnol.***11:1-7.
5. **Boulkour Touiouia S, Zaraî Jaouadi N, Bouacem K, Ben Ayede R, Rekik H, Zenati B, Kourdali S, Boudjella H, Sabaou N, Bejar S, El Hattab M, Badis A, Annane R et Jaouadi B (2018)**

Biochemical and molecular characterization of a novel metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* strain TBS09. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 107:2351-2363.

6. **Omrane Benmrad M, Moujehed E, Ben Elhoul M, Mechri S, Bejar S, Zouari R, Baffoun A et Jaouadi B(2018)**Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from *Penicilliumchrysogenium*strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 119:1002-1016.
7. **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 et Jaouadi B (2018)** Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkanderaadusta* strain CX-9. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 106: 636–646.
8. **Bouacem K, Laribi-Habchi H, Mechri S, Hacene H, Jaouadi B & Bouanane-Darenfed A.**Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilushirschii* strain KB-DZ44. ***Int. J. Biol. Macromol.***106 (**2018**) 338-350.
9. **Sahnoun M, Bejar S, Daoud L, Ayadi L, Brini F et Saibi W (2018)**Effect of *Agave americana* L. on the human, and *Aspergillus oryzae* S2 α-amylase inhibitions. ***Nat. Prod. Res.*** doi=10.1080/14786419.2017.1408094.
10. **Trabelsi S, Sahnoun M, Elgharbi F, Ameri R, Ben Mabrouk S, Mezghani M, Hmida-Sayari A et Bejar S (2018)** *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: production, purification and novel properties. ***Vol Mol. Biol. Rep.*** https://doi.org/10.1007/s11033-018-4548-2.
11. **Sellami S, Jemli S, Abdelmalek N, Cherif M, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S, Jamoussi K (2018)** A novel Vip3Aa16-Cry1Ac chimera toxin: enhancement of toxicity against *Ephestia kuehniella*, structural study and molecular docking. ***Int. J. Biol. Macromol.*** 117:752-761.
12. **El Arbi M, Ketata E, Neifar A, Mihoubi W, Gupta G.K, Pigeon P, Top S, Gargouri A, et Jaouen G (2018)** Aryl butenes active against K562 cells and lacking tyrosinase inhibitory activity as new leads in the treatment of leukemia. ***Mini-Rev.Med. Chem.*** 18 (15): 1294-1301
13. **Daoud L, Hmani H, Ben Ali M, Jlidi M, Ben Ali M (2018)** An original halo-alkaline protease from *Bacillus halodurans* strain US193: biochemical characterization and potential use as bio-additive in detergents. ***J. Polym. Environ.*** 26 (1): 23-32.
14. **BenFarhat-Touzri D, Jemli S, Driss F et Tounsi S (2018)** Molecular and structural characterization of a novel Cry1D toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: *Noctuidae*). ***Int. J. Biol. Macromol.*** 126:969-976.

2- Chapitres d'ouvrages scientifiques parus en 2018

1. Sondes Mechri et al. Proceedings of 3rd International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development, Tunisia 2018, pp. 250-253.
2. Mouna Ben Elhoul et al. Proceedings of 3rd International Conference on Integrated Environmental Management for Sustainable Development, Tunisia 2018. pp. 254-257.
3. Sondes Mechri, et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06109.
4. Maroua Omrane Benmrad et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06110.
5. Wacim Bejar et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06114.
6. Hatem Rekik, et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06116.
7. Houda Hmani et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06144.
8. Lobna Daoud et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06115.
9. Lobna Daoud et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06117.
10. Karim Jalleli et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-05891.
11. Fatma Abdmouleh et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-03-05070.
12. Mouna Jlidi et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06095.
13. Asmahen Akremi et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-05914.
14. Adel Hadj Brahim et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06126.
15. Adel Hadj Brahim et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06127.
16. Manel Ben Ali et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06135.

17. Manel Ben Ali et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06137.
18. Ameni Hadj Mohamed et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06134.
19. Abdmlouleh Fatma et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06133.
20. Ameni Hadj Mohamed et al. MOL2NET 2018. Doi: 10.3390/mol2net-04-06100.

3- Brevets déposés en 2018 (INNORPI et autres organismes internationaux)

1. **Raziqa H, Mechri S, Edouaouda K, Badis A, El Hattab M, Ben Elhoul M, Omrane Benmrad M, Zarai Jaouadi N, Rekik H, Bejar S, Jaouadi B (2018) P**roduction, purification et caractérisationbiochimique et moléculaire d'une nouvelle protéase nommée SPHM de la souche K7A de *Bacillus licheniformis*, candidate potentielle pour la formulation des détergents et la synthèse peptidique.***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 10 Janvier 2018 TN2018-0018.***
2. **Mechri S, Bouacem K, Zarai Jaouadi N, Ben Elhoul M, Omrane Ben Mrad M, Hacene H, Bejar S, Bourane-Darenfed A, Jaouadi B (2018)**Une nouvelle enzyme protéolytique microbienne d'intérêt industriel et environnemental. ***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 16 Novembre 2018 TN 2018-0388.***
3. **Neifar S, Bouanane-Darefed A, Mezghani M, Bouacem K, Jaouadi B, Bejar S(2018)**Une glucose isomérase thermoactive, thermostable et ayant une activité spécifique trés importante, codée par une séquence nucléotide nouvellement isolée et caractérisée.***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 13 Juin 2018 TN2018-0202.***
4. **Ameri R,Zarai Jaouadi N, Potocki Veronese G, Laville E, Mezghani M, Jaouadi B, Bejar S:** Une thiol peroxydase originale issue du microbiote fécal du dromadaire: thermoactive, thermostable et fonctionnant à des pH basique. ***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 17 Juillet 2018 TN2018-0249.***
5. **Daoud L, Hmani Ben Moussa H, Hadj Ibrahim A, Ben Ali M (2018)** Nouvelle amylase alcaline, thermostable et alotolérente de *Bacillus halodurans*. ***Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 20 Octobre 2018 TN 2018-363.***
6. **Daoud L, Hmani Ben Moussa H, Hadj Ibrahim A, Ben Ali M (2018)** Application dans la détergence d'une nouvelle amylase alcaline**Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 20 Octobre 2018 TN 2018-365.**

FORMATION DIPLOMANTE

1- Liste des thèses soutenues en 2018

1. HMANI Houda (ENIS: Génie Biologique: 17 /02/ 2018)*"*Etude d'un nouveau concept dans le choix d'un probiotique et application dans le domaine avicole et cunicole (Les probiotiques comme vecteurs d'enzymes)"(Directeur de thèse: Pr**. Mamdouh Ben Ali).**

2. AMERI Rihab (**FSS : Thèse en Sciences Biologiques : 15/09/2018).**Exploitation de l'ADN métagénomique du microbiote fécal du dromadaire pour l'étude de la biodiversité et le criblage d'enzymes d'intérêt industriel "(Directeur de thèse: Pr**. Samir BEJAR).**

2- Liste des mastères soutenus en 2018

1. **Sondes HAMDI: "**Purification et caractérisation biochimique de deux nouvelles peroxydases fongiques destinées pour la formulation des détergents et la dégradation des colorants textiles" (**FSS/Université de Sfax : Mastère de recherche en Biotechnologie Microbienne soutenu le 26/12/2018**).
2. **Fadoua JABEUR: "**Caractérisation des activités biologiques d'hydrolysat protéique et de la chitine des déchets de crustacés obtenus par la co-culture de trois bactéries protéolytiques " (**INAT/IRESA/Université de Carthage: Mastère de recherche en : Valorisation Biotechnologique des Ressources Marines (VBRM) soutenu le 14/11/2018**).

OUVERTURE DU LABORATOIRE SUR SON ENVIRONNEMENT

1/ Organisation des manifestations scientifiques

1. Organisation du 17ème **Journées Internationales de Biotechnologie (IDB2018/JIB 2018)** de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) ont eu lieu du 20 au 23 décembre 2018 à Sousse-Tunisie. **Pr. Samir BEJAR: Coordinateur; Pr. Adel SAYARI et Dr Bassem JAOUADI: Membres du comité scientifique et d'organisation**.
2. Organisation du 2ème**Maghrebian-FinnishBiotechnology Symposium (MFBS 2018)** qui a eu lieu du 19 au 23 mars 2018 à Juva-Finlande. **Pr. Samir BEJAR: Coordinateur; Pr. Adel SAYARI et Dr. Bassem JAOUADI: Membres du comité scientifique et d'organisation**.
3. Participation à l'organisation du « ***3rd International Conference on Integrated Environmental Management for SustainableDevelopment***. ICIEM-3 Tunisia 2018, du 2-5 mai 2018 à Sousse,Tunisie. **Membre du comité scientifique international : Dr. Bassem JAOUADI**.
4. ***International Conference on Multidisciplinary Sciences, 4th édition****MOL2NET 2018: du 15 au 20 Janvier 2018 CNAM, Paris, France*. **Membre du comité scientifique international : Pr**. Mamdouh BEN ALI.

2/Conventions/contrats avec des partenaires socio-économiques nationaux

1. **Convention de recherche MOBIDOC- Doctorants (Karima SALEM)**:**entre le LBMIE-CBS** et la Société Meunière Tunisienne : **"Elaboration d'un complexe enzymatique destiné pour la panification afin d'améliorer les propriétés de transformation de la pâte"** Date: 02/04/2018-1000DT/mois
2. **PAQ-COLLABORA 2018-2021 : Biotech-INNOV-CBS:** 4 start-ups du CBS (pépinière d'entreprises du CBS) dont 2 du LBMIE (Astrum Biotech et Biotech ECOZYM). ***Date de Création: 27/11/ 2018- 345 000 DT***
3. **Convention de Recherche Collaborative : entre le LBMIE-CBS et la Société de Détergence JMAL (EJM) 2018-2019, intitulé :** « Production d'enzymes (protéases, amylases et peroxydases) produites à partir de microorganismes isolées de biotopes tunisiens en vue d'une incorporation dans les produits de détergents de lavage de la société EJM » ***Date: 13/11/2018- 9 520 DT***
4. **Programme National de Promotion de l'Innovation Technologique « PNRI Dégraissage-Reverdissage »:** « Développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de traitement des peaux ovines : reverdissage, épilage-pelanage et dégraissage enzymatiques »2016-2018-*Déblocage de la deuxième tranche 31 8000 DT le 31/12/2018*
5. **Projet MOBIDOC/Post-Doc 2019-2020 au nom de Dr. Mouna BEN ELHOUL,** intitulé : « Monter une Start-up « Biotech ECOZYM »: Production d'enzymes écologiques destinées pour les industries de cuir, de textile, de détergence et d'agro-alimentaire » ***Date****: 30/11/2018- 1200 DT/Mois*
6. **Projet MOBIDOC/Post-Doc 2018-2019 au nom de Dr. Wassim BEJAR**, intitulé : « Production et incorporation d'un cocktail d'enzymes microbiennes (protéases, amylases et peroxydases) dans la formulation du produit de détergent Class de la Société de détergence JMAL « EJM ». **Date**: 30/03/2018-1200 DT/Mois

3/ Conventions dans le cadre de projets de coopération scientifique bilatérale.

1. **Renouvellement du projet de recherche-formation bilatéral conjoint Tuniso-Algérien 2012-2018/Code TA-04-2012,** intitulé : « *Criblage, étude biochimique et moléculaire, amélioration et application industrielle et environnementale de protéases et peroxydases de microorganismes pour la détergence, la tannerie et le bio-traitement des eaux de mer polluées* ». Partenaire: LBMIE-CBS (Sfax) & CNRDPA (Bou Ismaïl, Tipaza). ***10 000 DT***
2. **Programme de Recherche Tuniso-français PHC-UTIQUE code: 17G1215: 2017-2019:** Développement de nouvelles molécules antibactériennes : Repositionnement, pharmaco-modulation, synthèse et études biologiques**. Responsable: Dr. Mehdi ELARBI.** Montant de financement pour l'année 2018 en DT: **11100 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

COMPOSITION 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 Idriss ; Adel Tekari ; Imen Ayedi ; Salima Belguith-Maalej ; Imen Benrebeh ; 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 ; Sabrine BelMabrouk ; Rania Abdelhedi.
Etudiants en thèse : Hela Gargouri ; Emna Ayedi ; Rania Ammar ; Faten Abdelli ; Marwa Jardak ; Amal Bouzid ; Mariem Ayedi ; Mariem Moala

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 de 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.
- Etudier l'environnement cellulaire et déterminer les caractéristiques histologiques et anatomopathologiques et moléculaires des tumeurs du cancer du sein,
- Identification de nouveaux gènes du diabète monogénique par séquençage extentif des régions chromosomiques candidates.
- Construction d'une bibliothèque de molécules ayant des activités anti-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.
- 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 presbyacousie 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 et l'identification individuelle.

LISTE DES PROJETS :

1. **Projet 1 :** Identification, Criblage et validation de biomarqueurs de maladies multifactorielles (Dr N. KHARRAT & Pr A. REBAI).
2. **Projet 2 :** Ciblage des voies de signalisation impliquées dans la résistance microbienne : cas du biofilm microbien (Dr S. MNIF & Pr S. AIFA).
3. **Projet 3 :** Ciblage des voies de signalisation mammifère (Pr S. AIFA).
4. **Projet 4 :** Développement et application des molécules de synthèses pour la thérapie, Responsable: (Pr H. Hadj KACEM/Dr I. Ben RBEH).
5. **Projet 5 :** Développement de deux kits d'aide au diagnostic moléculaire et Criblage de molécules thérapeutiques des surdités par des technologies haut débit. (Pr. S. MASMOUDI)
6. **Projet 6 :** Développement de kits pour l'authenticité moléculaire.(Pr A. REBAI)

ACTIONS PAR PROJETS ET PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Projet 1 : Identification, Criblage et validation de biomarqueurs de maladies multifactorielles (Responsables : Dr N. KHARRAT & Pr A. REBAI)

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 chez des patients à régime méditerranéen et à haut risque ou atteints d'une maladie coronarienne suivant trois échelles de gravité. Un fiche de renseignement a permis de collecter des données démographiques de l'enrichir également par le comportement socioculturel vis avis des habitudes alimentaires adoptées. Un premier criblage des données nous a permis de classer les patients selon un score méditerranéen. A la base de ces résultats, nous avons pu constater que le régime alimentaire méditerranéen est abandonné au profil d'un autre en conformation avec l'évolution socio-économique.

En parfaite harmonie avec les facteurs antioxydants incriminés dans cette pathologie à savoir les protéines GPx et SOD. Le SOD semble le biomarqueur corrélé ($p<0.05$) avec les données cliniques et biologiques et principalement avec l'évolution de la maladie. Une augmentation de l'échantillon permettra d'affirmer ce biomarqueur sur le spectre de la maladie cardiovasculaire et particulièrement l'insuffisance cardiaque. 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.

Une biobanque d'ADN, de biopsie liquide, de données démographique, clinique et d'habitudes

environnementales est disponible pour un spectre de maladies cardiovasculaires large de degré évolutif (200 Coronarien, 150 Insuffisance cardiaque). Une collecte d'ADN 16s microbial à partir de la salive est également disponible, une analyse est en cours d'optimisation. Nous avons également intégré un registre national en coopération avec l'hôpital Hédi Chaker. Une évaluation de l'activité antioxydante totale (TAS) et également du GPx, SOD est en cours ainsi qu'une évaluation de la cytokine IL6 au niveau du plasma des patients colligés.

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.

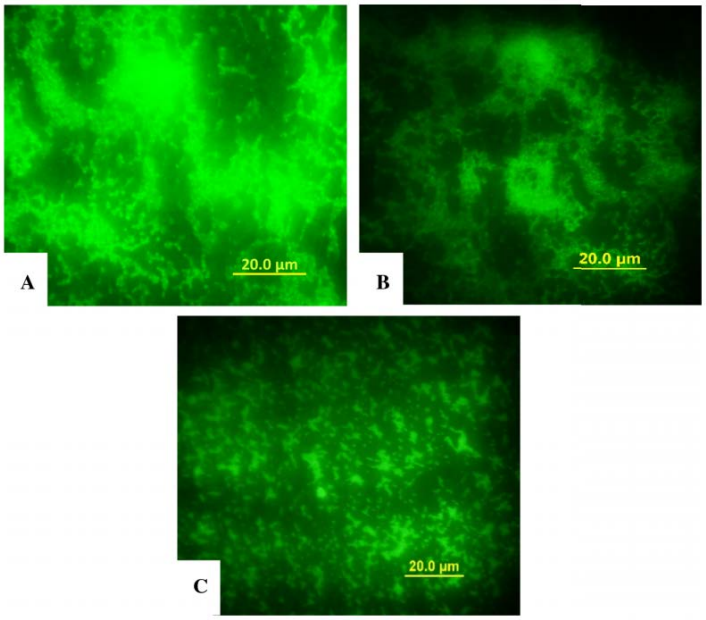
Les endocrinopathies : Les endocrinopathies sont des maladies qui se traduisent par une hyper ou hypofonctionnement d'une ou de plusieurs glandes endocrines. L'objectif principal de ce du projet est de décortiquer le réseau moléculaire responsable de l'émergence de ces pathologies au niveau génétique et/ou transcriptomique.

Nous avons identifié deux nouvelles mutations dans le gène KISS1-R pour deux familles Tunisienne non apparentées avec hypogonadisme hypogonadotrope congénitale (axe de l'IAH). Pour le MODY, nous avons réalisé le séquençage de deux exomes totaux (WES) pour deux membres appartenant à une de ces familles et nous avons réussi à valider la transmission de 4 variants délétères dans de 4 nouveaux gènes impliqués dans le mécanisme de sécrétion de l'insuline (en se basant sur les données de la littérature uniquement). La validation de l'effet pathogène et l'identification des variants responsables de l'hyperglycémie chez cette famille est en cours.

Projet 2 : Ciblage des voies de signalisation impliquées dans la résistance microbienne : cas du biofilm microbien (Responsables : Dr S. MNIF & Pr S. AIFA).

Les microorganismes endophytes sources de molécules à activité anti-biofilm : Après les criblages effectués précédemment, l'extrait de la souche endophytique 15F affiliée au genre *Bacillus* et qui contient les C_{13}, C_{14} et C_{15} surfactines comme molécules majoritaires a été utilisé pour l'évaluation de l'activité anti-biofilm sur les premières phases de formation (activité anti-adhérente) et sur un biofilm formé (activité d'éradication). Après optimisation, les résultats montrent que les surfactines exercent une activité anti-adhérente intéressante avec des inhibitions de l'ordre de 90% à 0.0625 mg/ml et une activité d'éradication de l'ordre de 80% sur le biofilm de la souche *Staphylococcus epidermidis* S61. D'autres travaux sont en cours de réalisation qui concernent la dégradation des HSL, molécules impliquées dans le système de communication de type quorum sensing moyennant l'utilisation d'enzymes produites par les microorganismes endophytes.

Une autre souche du genre *Bacillus* proche de l'espèce *Bacillus safensis* produit un tensioactif à propriétés antiadhésive intéressante. Le biosurfactant produit parait être composé de deux dérivés de surfactine en C_{13} et C_{14}. L'activité antiadhésive de ce biosurfactant sur le modèle de biofilm de *Staphylococcus epidermidis* S61 montre une inhibition de l'adhésion des cellules de S61 de l'ordre de 90% quand la surface est recouverte de surfactines à une concentration d'environ 10 mg/ml. L'activité antiadhésive a été confirmée aussi par microscopie à fluorescence comme le montre la figure ci-dessous.



Images obtenues par microscopie à fluorescence (X40) de l'activité anti-adhésive de l'extrait brut (b) et de la fraction acétonitrile (c) contre le biofilm de Staphylococcus epidermidis S61 en comparaison avec le control non-traité (A)

Développement d'un modèle de Pansement antibiofilm : Cette partie du travail vise à développer *in vitro* un modèle de pansement antibiofilm pour évaluer l'efficacité d'un traitement contre les plaies à lente guérison et cicatrisation suite à la formation et la contamination de bactéries filmogènes comme les espèces de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres espèces qui pourraient être présentes. Dans notre cas, des molécules sélectionnées à partir de celles produites par les micro-organismes endophytes ont été utilisées dans ce modèle pour vérifier leur potentiel de guérison des plaies présentant des infections à biofilm par *S. epidermidis*. Les résultats obtenus montrent que les pansements ainsi développés pourraient réduire significativement le nombre de cellules. En effet, une diminution du log (CFU/ml) qui atteint presque 7 a été enregistrée quand le pansement ainsi façonné a été recouvert par les molécules de la souche 15F. Nous continuons les expériences dans cette piste pour essayer d'optimiser tous les paramètres en vue de développer un pansement « smart » efficace contre les plaies infectées avec des bactéries formatrices de biofilm.

Projet 3 : Ciblage des voies de signalisation mammifère. (Pr S. AIFA).

En plus de notre collaboration avec des laboratoires de chimie procurant des molécules de synthèse à tester sur les lignées tumorales, nous avons opté pour le criblage des médicaments connus afin de les repositionner en termes d'activité antitumorale. Notre choix dans le présent travail a été fait sur des médicaments traitant les effets secondaires du traitement anticancéreux dont la diarrhée. La présente étude a tenté de repositionner des médicaments antidiarrhéiques connus : le nifuroxazide et le rifaximine.

*Effets du nifuroxazide (nif) et de la rifaximine (rif) sur les lignées cellulaires :*Pour évaluer les effets du nifuroxazide (nif) et de la rifaximine (rif) sur les lignées cellulaires du cancer du sein, des lignées cellulaires MCF-7, T47D, MDA-MB-231 et une lignée cellulaire non cancéreuse (HEK293) ont été utilisées dans cette étude. Nous avons ensuite étudié les effets du nifuroxazide et de la rifaximine sur les cellules du cancer du sein en fonction du temps et de la concentration.

L'exposition des cellules MCF-7 à des concentrations croissantes de nif ou de rif pendant 24h, 48h et 72h a entraîné une diminution de la croissance cellulaire. De plus, les valeurs de CI50 des deux médicaments étaient généralement stables pendant les trois jours d'exposition. Les cellules T47D et MDA-MB-231 étaient moins sensibles au nif et au rif que le MCF-7 après 24 et 48

heures d'exposition et la CI50 était supérieure à 100 µM. La diminution de la viabilité cellulaire des lignées cellulaires du cancer du sein traitées au nif était décrite avant sur les cellules 4T1, MCF-7 et MDA-MB-231, mais MDA-MB-231 semblait plus sensé que MCF-7, comme le montre le test MTT. Cependant, dans notre cas après 72h d'exposition, la CI50 de nif a diminué dans les cellules T47D ou MDA-MB-231 pour se rapprocher de sa CI50 dans MCF-7 (6,39 µM), tandis que la valeur IC 50 (75,76 µM) malgré sa diminution reste supérieure à celui des cellules MCF-7. L'effet antitumoral du rif est moins étudié selon la littérature que le nif. Le rif pourrait avoir une cytotoxicité potentielle spécifique à la tumeur.

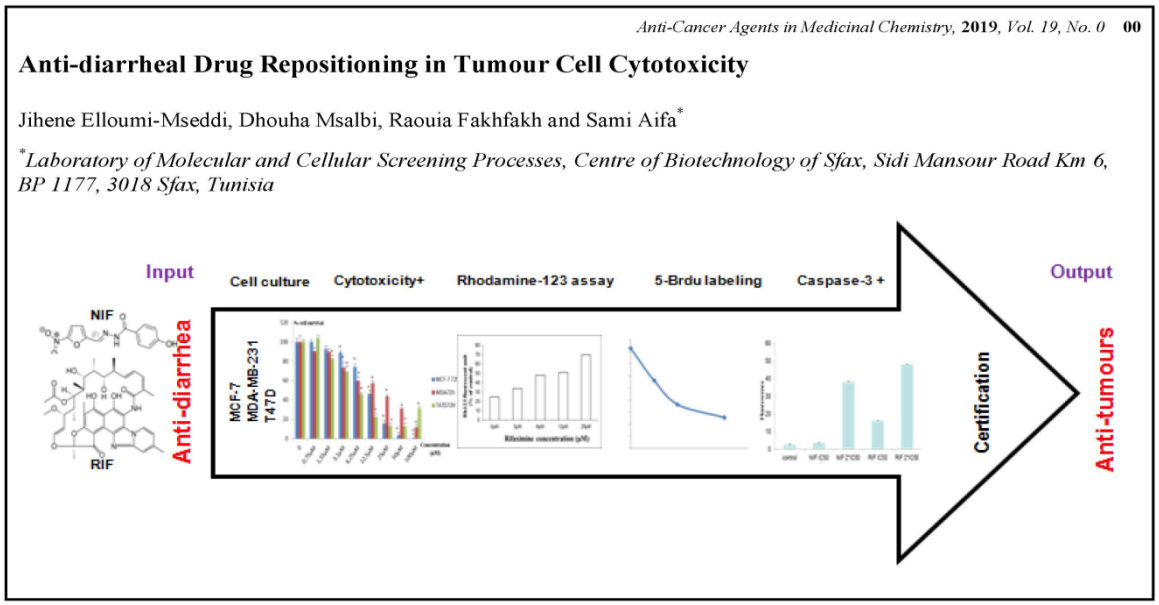
*Nif et rif améliorent l'accumulation intracellulaire de Rh-123 dans les cellules MCF-7 :*Nous avons mesuré l'accumulation de Rh-123 fluorescent dans des cellules MCF-7 traitées avec du nif et du rif. Après le prétraitement avec diverses concentrations de nif et de rif, les cellules MCF-7 ont une accumulation intracellulaire significative de Rh123 dans les cellules traitées. Vraisemblablement nif et rif ont entraîné une dépolarisation dépendante de la concentration dans les mitochondries. En fait, le pourcentage de cellules perturbées du potentiel de la membrane mitochondriale (MMP) a augmenté de 25% à 80% et de 70% après les traitements.

Effet de nif et rif sur la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire : Nous avons utilisé la technique de marquage BrdU et le kit de détection III basés sur le principe de la cellule Elisa. L'absorbance (A405 nm / A492nm) était réduite lorsque la concentration de nif ou de rif était augmentée, suggérant que les deux traitements nif et rif inhibaient la prolifération cellulaire et bloquaient la synthèse de l'ADN.

Induction d'apoptose par Nif dans les cellules MCF-7 : Nous avons utilisé le kit de dosage EnzChek Caspase-3 qui permet la détection de l'apoptose en analysant l'augmentation de la caspase-3 et d'autres activités de protéase spécifiques à la DEVD (par exemple, la caspase7). Une augmentation significative de l'expression de la caspase a été produite dans les cellules traitées avec nif ou rif par rapport aux cellules non traitées et proportionnelle à l'augmentation de la concentration en médicament.

Nos données et les recherches décrites dans la littérature font de nif et rif de bons candidats en tant que médicaments antitumoraux, tout en prévenant la diarrhée (principal effet secondaire de nombreux traitements du cancer). Puisque le rif semble moins toxique pour la lignée cellulaire non tumorale, il pourrait être plus puissant pour le traitement du cancer.

Nous avons utilisé deux médicaments antidiarrhéiques nif et rif et effectué des tests de dépistage permettant de détecter l'activité antitumorale sur les lignées cellulaires du cancer du sein. Les valeurs IC50 enregistrées sont intéressantes car elles sont inférieures à celles obtenues avec des médicaments chimiothérapeutiques connus tels que le cis-platine et correspondent à des doses non toxiques de HERK293 (la lignée cellulaire non tumorale), en particulier celles de rif. Les deux médicaments présentent des spécificités différentes mais sont plus efficaces contre les cellules MCF-7. De plus, la cytotoxicité obtenue conduit à l'apoptose, comme le montre en particulier la libération de l'activité de la caspase-3. Nif et rif sont utilisés pour surmonter les effets secondaires diarrhéiques des médicaments anticancéreux et se sont avérés être aussi des médicaments antitumoraux qui en font des médicaments à double efficacité contre le cancer et les effets secondaires de la chimiothérapie.



Résumé graphique du repositionnement de nif et rif en activité antitumorale

<u>Projet 4 :</u> Développement et application des molécules de synthèses pour la thérapie (Responsables : Pr H. Hadj KACEM/Dr I. Ben RBEH)

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 totales 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 ont été confirmée aussi sur des cellules épithéliales de poumons (A549). Cette lignée cellulaire, a été choisie pour réaliser l'induction par IL4.
Pour chaque siRNA, trois conditions de culture de cellules sont prévues avec ou sans stimulation par l'IL4: 1- cellules transfectées avec les siRNA ,2- cellules transfectées avec les siRNA témoins et 3- cellules mises en culture sans transfection. L'évaluation de l'amplitude de la réponse cellulaire à l'exposition des cytokines est en cours d'évaluation par la quantification de l'expression du gène SLC26A4 ainsi que le dosage de la protéine MUC5AC sera réalisé par un test ELISA approprié. Les effets des trois siRNA sur le transcriptome ont été envoyés pour évaluation par RNA Seq moyennant la nouvelle génération de séquençage (NGS) (résultats en cours). Cette approche à haut débit d'analyse permettra la confirmation d'une part de la spécificité ainsi que l'efficacité de nos siRNA et d'autre part l'identification des gènes et des voies affectés par l'atténuation de notre cible thérapeutique SLC26A4 particulièrement les voies impliquant les gènes CFTR, MUC5A et les transporteurs d'ions.

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

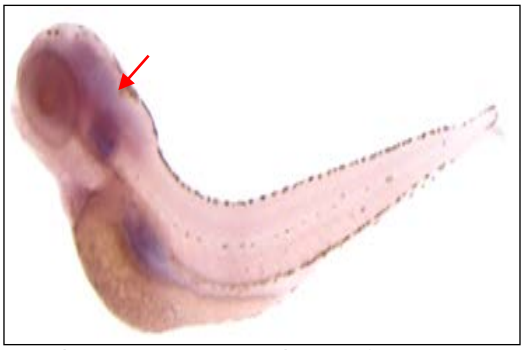
Développement d'un deuxième kit de séquençage haut débit à façon HaloPlex^{HS} d'une capacité de 48 échantillons: Au cours de l'année 2018, nous avons établi de nouvelles collaborations directs avec des laboratoires spécialisés en diagnostic génétique, ou indirects avec des services cliniques à travers ces laboratoires. De ce fait, nous avons mis en place une phase de preuve du concept par l'analyse par séquençage haut débit de quelques échantillons tests pour les différents membres de ce large consortium. Ainsi, nous avons eu des premiers indicateurs de performance, de conformité et de rentabilité du projet.
L'élargissement de notre réseau de collaborateurs «clients» a permis d'augmenter le nombre de tests demandés et par conséquent de développer un kit de séquençage à façon à moindre coût pour l'aide au diagnostic de maladies héréditaires dans la population Nord Africaine. En effet, nous avons développé un deuxième kit de séquençage haut débit à façon HaloPlex^{HS} permettant le multiplexage jusqu'à 48 échantillons. Une des caractéristiques de ce kit est l'utilisation des codes à barres moléculaires permettant de diminuer les variants faux positifs et faciliter l'analyse des données. Le choix des maladies et de gènes est fait selon les demandes de nos partenaires. Généralement, les pathologies choisies répondent aux critères suivants: génétiquement hétérogènes, taille importante de la séquence codante et présentant un intérêt diagnostique. L'ensemble des gènes choisis couvrent une région de l'ordre de 330 kb. Les sondes, correspondants aux exons codants des gènes d'intérêt et aux régions flanquantes, ont été choisies moyennant le logiciel SureDesign.
Plusieurs standards ont été mis en place pour réussir les manipulations d'enrichissement par le kit HaloPlex^{HS}. Les ADNs à séquencer sont sélectionnés suivant des critères stricts de concentration et de pureté. Après enrichissement, des tests de contrôle de la qualité et de la quantité des librairies sont effectués par fluorométrie. Un ADN (Phix) est ajouté dans chaque librairie comme contrôle interne des différents paramètres du "run" (génération de clusters, séquençage et alignement). Nous avons optimisé l'ensemble des étapes pour que l'analyse soit réalisée seulement en 3 jours.
Dans une première manipulation, onze ADNs extraits de patients atteints d'une surdité ou d'un cancer du sein sont séquencés en parallèle. Le séquençage haut débit de ces échantillons d'ADN

est réalisé avec le séquenceur MiSeq (Illumina) et ceci suite à une étape de clusterisation sur une cellule en flux. Il est important de signaler que l'expertise acquise pour les techniques de séquençage avec ce séquenceur a été nécessaire pour bien reussir cette manipulation. Pour que le séquençage piuisse avoir lieu moyennant le kit HaloPlex^{HS} où l'indexation est simple (à la différence des kits d'Illumina où l'indexation est double), des modifications au niveau de la fiche de route ont étés apportées. Moyennant le logiciel SureCall (Agilent Technologies), les séquences obtenues sont assemblées puis alignées à des séquences de références de régions correspondantes aux 81 gènes ciblés. L'analyse bio-informatique a révélé des mutations chez 5 patients parmi 11. Ces mutations sont validées par séquençage classique de Sanger.

Dans un deuxième temps, 34 ADNs atteints de diverses pathologies ont été séquencé en parallèle: maladies sensorielles [surdité isolée (5 ADNs), Syndrome de Perrault (2 ADNs)], Cancer du sein/ovaire/colon (16 ADNs), Maladies dermatologiques (Dyschromie congénitale Cole (1 ADN), Syndrome de Netherton (1 ADN)), Maladies cardiaques (Syndrome de Marfan (3 ADNs)), Syndrome de Noonan (4 ADNs), Alagille (2 ADNs). L'analyse bioinformatique a révélé la présence de mutations chez 12 patients parmi 34. Ces mutations sont de type frame shift ou bien faux sens. Pour les 22 autres échantillons, des analyses approfondies des résultats de séquençage sont en cours. En conclusion, à travers ce projet, nous avons répondu á des prestations complexe de haut niveau et permettre à nos partenaires d'assurer le diagnostic moléculaire de diverses maladies héréditaires. La réalisation de ces analyses en Tunisie nous évitera de les sous-traiter dans des laboratoires privés en Europe ou aux USA et par conséquent d'éviter des payements en devises avec toutes les implications négatives pour l'économie nationale. Au cours de cette année, nous avons réussi à baisser (de moitié) le coût d'analyse moléculaire qui est passé de 1600DT à 790DT seulement.

Biomarqueurs génomiques et épigénomiques de la surdité liée à l'âge : Parmi les gènes sous-exprimés selon nos analyses transcriptomiques antérieures, *OTOS* et *SLC26A11* ont été précédemment sélectionnés comme biomarqueurs intéressants pour des analyses approfondies. Pour l'étude de leurs expressions, en utilisant le modèle sauvage du poisson zèbre, nous avons réussi à mettre au point la technique d'hybridation *in situ* chez des embryons âgés de quelques heures jusqu'à cinq jours après fertilisation. Par conséquent, nous avons montré que le gène *otos* est exprimé au niveau de l'oreille interne. Particulièrement, son expression commence à 120 heures après fertilisation et elle est maintenue jusqu'au stade adulte.

Les observations microscopiques montrent qu'il est exprimé dans l'ensemble de l'épithélium sensoriel des crêtes et macules (figure-cidessous). De même, nous avons montré l'expression spécifique du gène *slc26a11* dans l'oreille aussi bien des embryons que des adultes du poisson zèbre. Ce gène, un transporteur anionique, constitue une cible potentielle pour le criblage de molécules thérapeutiques. Ces observations suggèrent que les gènes *otos* et *slc26a11* pourraient jouer un rôle clé dans le développement des structures auditives (embryon). De plus, étant donné que leur expression est maintenue dans l'oreille chez l'adulte, il est possible que ces gènes soient aussi essentiels pour la fonction de l'oreille interne. Afin d'étudier cette implication dans la morphologie et/ou le fonctionnement de l'oreille et de cribler par la suite des molécules thérapeutiques, nous avons conçus des guides RNA d'un système Crispr-Cas9 pour induire le knock-down transitoire de ces gènes. Toutefois, le retard dans l'acquisition du micro-injecteur a tardé l'avancement de ces travaux.



Expression du gène otos chez le poisson zèbre (5 jpf) par hybridation in situ

Projet 6 : Développement de kits pour l'authenticité moléculaire. (Responsable : Pr S. MASMOUDI)

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 détectés 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 test a été fait avec l'huile de maïs et de tournesol et a montré une bonne capacité de discrimination mais qui reste moins sensible, pour les faibles mélanges (moins de 5%), que les méthodes basées sur les analyses chimiques. Nous envisageons d'élargir notre panel de marqueurs pour la traçabilité en introduisant le séquençage NGS.

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 est plus grande. 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. L'objectif de cette action, 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 les années précédentes d'activité, plus de 400 ADN du cheptel tunisien ont été collecté. Ces échantillons ont été utilisés pour séquencer des fragments particuliers de l'ADN mitochondrial (trois amplicons). L'analyse bioinformatique avancée (développement d'un programme spécifique d'analyse sous R) nous a permis de déterminer les séquences les plus discriminantes c'est-à-dire les variants spécifiques à chaque espèce, et des variants qui pourraient être utilisés pour pister les origines géographiques des espèces présentes dans l'aliment (races de mouton par exemple). Le projet est terminé est sera clôturé par le développement d'un kit associé à un système d'identification en ligne permettant l'identification

de la composition d'un produit carné quelconque après séquençage de l'ADN extrait de ce produit pour au moins un des trois fragments proposés.
Identification individuelle : Cette action a été renforcée par les travaux financés dans le cadre du projet PRF dont l'objectif est la mise en place d'une banque de données biométriques multimodales de lutte contre le terrorisme. Ainsi, au lieu de cibler les marqueurs de type STR, nous avons orientés nos recherche vers le séquençage haut-débit de 443 régions du génome nucléaire où nous avons pu identifier 441 marqueurs SNP assurant une forte discrimination entre individus et qui sont corrélés à certains traits du visage.

Tableau récapitulatif des activités

Articles	Thèses en cours	Brevets	Participations congrès	Mastères soutenus	Thèses soutenues	Conférences organisées
23	10	2	6	4	1	1

Liste de Publications parues en 2018 (en gras chercheurs membres du laboratoire)

1. **Sghaier N, Ben Ayed R, Ben Marzoug R, Rebai A**. Dempster-Shafer Theory for the Prediction of Auxin-Response Elements (AuxREs) in Plant Genomes. *Biomed Res Int*. 2018: 3837060.
2. **Sghaier N, Ben Ayed R**, Gorai M, **Rebai A**. Prediction of auxin response elements based on data fusion in Arabidopsis thaliana. Mol Biol Rep. 2018, 45: 763-772
3. **Ben Ayed R**, Ennouri K, Ercişli S, Ben Hlima H, Hanana M, Smaoui S, **Rebai A**, Moreau F. First study of correlation between oleic acid content and SAD gene polymorphism in olive oil samples through statistical and bayesian modeling analyses. *Lipids Health Dis*. 2018 17: 74.
4. **Ayadi EZ, Cherif B**, Ben Hamed Y, Mokni M, **Rebai A, Ayadi H**, Jlidi R. Prognostic Value of BCL2 in Women Patients with Invasive Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018, 19: 3557-3564.
5. **Kharrat N, Boumellasa R, Belmabrouk S, Benmarzoug R, Rebai A**. Charge clusters signatures in prokaryotic proteomes: Temperature-dependence and distribution. *Genomics*. 2018, S0888-7543.
6. **Bouzid A, Smeti I, Chakroun A, Loukil S**, Gibriel AA, Grati M, Ghorbel A, **Masmoudi S**. CDH23 Methylation Status and Presbycusis Risk in Elderly Women. *Front Aging Neurosci*. 2018, 10: 241.
7. **Bouzid A, Smeti I,** Dhouib L, Roche M, Achour I, Khalfallah A, Gibriel AA, Charfeddine I, **Ayadi H**, Lachuer J, Ghorbel A, Petit C, **Masmoudi S**. Down-expression of P2RX2, KCNQ5, ERBB3 and SOCS3 through DNA hypermethylation in elderly women with presbycusis. *Biomarkers*. 2018, 23: 347-356.
8. Imtiaz A, Belyantseva IA, Beirl AJ, Fenollar-Ferrer C, Bashir R, Bukhari I, **Bouzid A**, Shaukat U, Azaiez H, Booth KT, Kahrizi K, Najmabadi H, Maqsood A, Wilson EA, Fitzgerald TS, Tlili A, Olszewski R, Lund M, Chaudhry T, Rehman AU, Starost MF, Waryah AM, Hoa M, Dong L, Morell RJ, Smith RJH, Riazuddin S, **Masmoudi S**, Kindt KS, Naz S, Friedman TB. CDC14A phosphatase is essential for hearing and male fertility in mouse and human. *Hum Mol Genet*. 2018, 27: 780-798.
9. Chaabane S, Messedi M, Akrout R, Ben Hamad M, Turki M, Marzouk S, Keskes L, Bahloul Z, **Rebai A**, Ayedi F, Maalej A. Association of hyperhomocysteinemia with genetic variants in key enzymes of homocysteine metabolism and methotrexate toxicity in rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res*. 2018, 7: 703-710.
10. Khabou B, Tabebi M, Siala-Sahnoun O, Mkaouar-Rebai E, **Rebai A**, Fakhfakh F. Potential dysfunctional effects of synonymous variants: Insights from an exhaustive in silico analysis of the ABCB4 gene. *Ann Hum Genet*. 2018 82: 457-468.

11. Kharrat N, Salem H, Mrabet A, Aloui F, **Triki S**, Fendri A, Gargouri Y. Synergistic effect of polysaccharides, betalain pigment and phenolic compounds of red prickly pear (Opuntia stricta) in the stabilization of salami. *Int J Biol Macromol*. 2018, 111: 561-568.
12. **Elloumi-Mseddi J, Mnif S**, **Akacha N, Hakim B**, Pascal Pigeon P, Jaouen J, Top S, **Aifa S**. Selective cytotoxicity of arene tricarbonylchromium towards tumour cell lines, *Journal of Organometallic Chemistry*, 2018, 862: 7-12.
13. Bouhajja H, **Abdelhedi R**, Amouri A, Hadj Kacem F, Marrakchi R, Safi W, Mrabet H, Chtourou L, Charfi N, Fourati M, Bensassi S, Jamoussi K, Abid M, Ayadi H, Mnif-Feki M, Bougacha-Elleuch N. Potential role of liver enzyme levels as predictive markers of glucose metabolism disorders in a Tunisian population. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018 , 96: 1171-1180.
14. Bouhajja H, Kacem FH, **Abdelhedi R**, Ncir M, Dimitrov JD, Marrakchi R, Jamoussi K, **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 Adult Tunisian Population. *Can J Diabetes*. 2018, 42: 263-271.
15. Smichi N, Othman H, Achouri N, Noiriel A, **Triki S**, Arondel V, Srairi-Abid N, Abousalham A, Gargouri Y, Miled N, Fendri A. Efficient heterologous expression, functional characterization and molecular modeling of annular seabream digestive phospholipase A(2). *Chem Phys Lipids.* 2018, 211: 16-29.
16. Hanana M, Mezghenni H, **Ben Ayed R**, Ben Dhiab A, Jarradi S, Jamoussi B, Hamrouni L. Nutraceutical potentialities of Tunisian Argan oil based on its physicochemical properties and fatty acid content as assessed through Bayesian network analyses. *Lipids Health Dis*. 2018, 17: 138.
17. Mzid R, Zorrig W, **Ben Ayed R**, Ben Hamed K, Ayadi M, Damak Y, Lauvergeat V, Hanana M. The grapevine VvWRKY2 gene enhances salt and osmotic stress tolerance in transgenic Nicotiana tabacum. *3 Biotech*. 2018, 8:277.
18. Smaoui S, Ennouri K, Chakchouk-Mtibaa A, Sellem I, Bouchaala K, Karray-Rebai I, **Ben Ayed R**, Mathieu F, Mellouli L. Modeling-based optimization approaches for the development of Anti-Agrobacterium tumefaciens activity using Streptomyces sp TN71. *Microb Pathog*. 2018 , 119:19-27.
19. Jaballi I, Saad HB, Bkhairia I**, Cherif B**, Kallel C, Boudawara O, Droguet M, Magné C, Hakim A, Amara IB. Cytoprotective Effects of the Red Marine Alga Chondrus canaliculatus Against Maneb-Induced Hematotoxicity and Bone Oxidative Damages in Adult Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2018,184: 99-113.
20. Kammoun I, Ben Salah H, Ben Saad H, **Cherif B**, Droguet M, Magné C, Kallel C, Boudawara O, Hakim A, Gharsallah N, Ben Amara I. Hypolipidemic and cardioprotective effects of Ulva lactuca ethanolic extract in hypercholesterolemic mice. *Arch Physiol Biochem*. 2018, 124: 313-325.
21. Feki-Sahnoun, W, Hamza A, Béjaoui B, Mahfoudi M, **Rebai A**, Bel Hassen M. 2018. Multi-table approach to assess the biogeography of phytoplankton: ecological and management implications. *Hydrobiologia* (2018) 815: 229.
22. Feki-Sahnoun W, Njah H, Hamza A, Barraj N, Mahfoudi M, **Rebai A**, Bel Hassen M. Using general linear model, Bayesian Networks and Naive Bayes classifier for prediction of Karenia selliformis occurrences and blooms. *Ecological Informatics*. 2018, 43: 12-23.
23. Masmoudi S, Magdich S, Rigane H, Medhioub K, **Rebai A**, Ammar E. Effects of Compost and Manure Application Rate on the Soil Physico-Chemical Layers Properties and Plant Productivity. 2018. *Waste Biomass Valor*. 1-12

Formation Diplômante

I/ Thèses de doctorat soutenues en 2018

Sabrine Belmabrouk: ‘Identification de régions chargées dans les protéines : détection, annotation fonctionnelle et structurale et étude comparative entre protéomes’ soutenue Janvier 2018.

II/ Mastères de recherche soutenus en 2018

1. Randa Ben Akacha (encadreur : Adel Tekari) : « Rôle de l'acide phytique sur l'ossification des lignées pré-ostéoblastiques et dans le modèle poisson zèbre ». FSS. Soutenu le 14/12/2018
2. Fatma Hamed (encadreur: Dorra Driss) : « Etude des domaines tyrosines kinases de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique Humain (EGFR): clonage et expression dans le système *Pichia pastoris*», soutenu le 15/12/2018 (FSS)
3. Imen Elgaoud (encadreur: Dorra Driss) « Approche protéomique pour la détection des cibles cellulaires d'un inhibiteur compétitif des tyrosines kinases de l'EGFR Humain », soutenu le : 18/12/2018 (FSS)
4. Imen Bedoui (encadreur : Meriem Ben Said) « Application de technologies haut débit pour la recherche de mutations responsables de maladies héréditaires en Tunisie » soutenue décembre 2018.
5. Marwa Hamdi (encadreur : Med Ali Mosrati) Utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle pour mettre en évidence l'effet d'une mutation du gène SSBP1 responsable d'une surdité héréditaire autosomique récessive non syndromique. Soutenu le 24/12/2018 (FSS).

Organisations des manifestations scientifiques en 2018

Atelier Zebrafish du 17 au 20 avril 2018 dans le cadre du projet Tuniso-Allemand TUNGER

Liste des Projets Financés en cours 2018:

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 : 38.600 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 : 54.000 DT
5. Projet (PRF) : PARADIS: plateforme Big Data pour les allergies alimentaires en Tunisie. Budget : 53.000 DT
6. Projet Post-PFE (Meriem Ben said), Budget: 22.000 DT
7. Projet d'Encouragement des Jeunes Chercheurs (Kharrat N, Mnif S, Driss D), Budget : 30.000 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
Ilem HASSAIRI	Ingénieur Général, chef de l'US
Adel ZITOUN	Ingénieur en Chef
Najoua AYEDI	Ingénieur Principal
Imen REKIK	Assistant principal hors grade à l'application et à la recherche
Nizar ELLEUCH	Assistant principal à l'application et à la recherche scientifique
Kamel M'RAD	Assistant principal à l'application et à la recherche scientifique
Faiçal BOUKHILI	Technicien
Leila ELLEUZ	Ingénieur Principal Contractuel
Mohamed AMRI	Ouvrier

OBJECTIF GLOBAL

L'unité de valorisation a pour objectifs de développer, stimuler, accompagner et valoriser les travaux et résultats de la recherche scientifique ainsi que de l'innovation au sein des entreprises (tissu socio-économique), tout en renforçant les liens entre ces dernières et le monde de la recherche scientifique.
L'objectif global de l'Unité spécialisée (US) est de contribuer au développement des produits de la recherche élaborés au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) et d'engager une collaboration durable avec le monde socio-économique.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

Les objectifs spécifiques de l'unité spécialisée (US) sont :

- Réaliser, en collaboration avec les laboratoires du CBS, des expériences de scale-up, de production, de formulation et de conditionnement à l'échelle pilote pour le développement de divers procédés et produits ;
- Accompagner les chercheurs du CBS dans la maîtrise et l'utilisation de différentes technologies développées à l'unité (US) et la production de divers bioproduits ;
- Produire à grande échelle (pilote) des cellules et/ou des métabolites (enzymes ou autres) par la technologie de fermentation pour une éventuelle application industrielle ;
- Développer et Intégrer des bioprocédés et/ou produits innovants pour le compte du tissu socio-économique ;
- Résoudre certaines contraintes technologiques rencontrées par les industriels dans leurs activités.

ACTIVITES DE L'UNITE UVRR

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

- ***1ère activité :*** Développement et transfert de nouveaux procédés et bioproduits destinés à l'amélioration des produits à base de figue de barbarie.
- ***2ème activité*** : Valorisation technologique et transfert des antioxydants dans des produits alimentaires.
- ***3ème activité :*** Prestation de services pour les différents laboratoires de recherche du CBS ainsi que pour le monde académiques et le tissu socioéconomique.

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

Dans le cadre du projet Européen CINEA 'Premier forum R21 de la recherche à l'industrie', l'Unité (US) a proposé de travailler sur un projet intitulé : '*Développement et transfert de*

nouveaux bioprocédés et /ou bioproduits aux partenaires socio-économiques'. Un partenaire industriel tunisien (La Société NOPAL) fait partie dudit projet et a été mobilisé pour l'application, dans ses procédés de productions, des produits et/ou procédés à valeurs ajoutées élaborés au sein de l'unité. L'objectif principal de 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.

I .1. Développement d'un procédé d'extraction des huiles de pépins de figue de barbarie basé sur la technologie enzymatique

Lors de cette dernière décennie, on assiste à une intensification remarquable des programmes de recherche mettent en évidence un intérêt grandissant à la farine de pépin de figue de barbarie. Les pépins de la figue de barbarie représentent 10 à 15% de la pulpe comestible. L'huile des pépins constitue 7-15% du poids entier, caractérisée par un niveau important en acides gras insaturés où l'acide linoléique est l'acide gras principal [1, 2]. La richesse de l'huile de graines de figue de barbarie en matières insaponifiables et acides gras essentiels, en stérols et vitamine E ont en fait un bon atout pour son exploitation en cosmétologie [3]. Elle a été utilisée comme un agent exfoliant, anti-age et anti-oxydant. Elles aident à lutter contre le dessèchement cutané, à améliorer l'hydratation, à ralentir le processus de vieillissement de la peau et à prévenir la formation des rides.

L'extraction par presse à froid permet d'extraire une quantité d'huile de figue de barbarie inférieure à celle par solvant d'environ 30% à 50%. Cependant, la concentration de principes actifs (vitamine E, Stérols, Oméga 6) y est plus importante. Ce procédé délivre un coproduit dit tourteau très riche en protéine (11-12%), en cellulose (30%), en molécules actives et riche en acide gras essentiels (0,7- 1,2%) [3] d'où sa valorisation devient nécessaire.

I.1.1 Extraction Enzymatique : Criblage des enzymes

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 de pépins de figue de barbarie. Elle consiste à soumettre la substance végétale en solution aqueuse en contact avec une solution enzymatique dans un réacteur sous agitation contrôlée. Pour ce faire, les enzymes présélectionnées (locales ([XCBS] et [CCBS]) ou commerciales ([PL] et [XL])) 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, améliorer le taux d'extraction d'huile et sa qualité du point de vu teneur en acide gras essentiels (les acides gras insaturés) à savoir l'acide oléique et l'acide linoléique.

Le but de l'extraction enzymatique étant d'extraire l'huile "enfermée" dans des matrices complexes de pépins. Cette opération dépond étroitement de l'intégrité structurale de la paroi cellulaire de la matière végétale et de la taille des molécules formant la fraction lipidique à faire sortir d'une telle matrice.

L'efficacité du choix des enzymes est évaluée en fonction de la détermination du taux des huiles extraits par rapport au taux initiaux actuellement (en industrie) extraits des pépins et de tourteau secs de figue de barbarie et en fonction de la qualité du produit.

Les enzymes locales utilisées ([XCBS] et [CCBS]) ont été produites à l'unité et ce en collaboration étroite avec le laboratoire de biotechnologie moléculaire des eucaryotes du CBS (LBME). Les souches utilisées pour la production des enzymes [XCBS] et [CCBS] sont *Taloromyces thermophilus et RUTC30,* respectivement. Ces souches nous ont été confiées par le laboratoire (LMBE) du CBS. La production et la formulation de ces enzymes ont été réalisées

dans un fermenteur de capacité totale 20 L suivi d'une séparation membranaire.

L'objectif principal de ce travail est le criblage des enzymes montrant une grande capacité au produit d'intérêt et l'optimisation des paramètres qui influent sur l'extraction enzymatique des huiles de pépins de figue de barbarie ainsi que sur la qualité du produit. 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 tourteaux caractérisées par une teneur en matière grasses variable.

L'analyse des résultats obtenus a montré que le pourcentage d'extraction des huiles varie entre 3,1% et 6,6 % pour le cas des pépins (Tableau 1) alors qu'il varie entre 0,6 et 1,09 % pour le cas des tourteaux (Tableau 2) et ce selon l'enzyme utilisée. En effet, l'enzyme [XCBS] donne le meilleur rendement d'extraction (soit 61,5 %) pour la farine de pépin. Les enzymes [XL], [CCBS] et [PL] donnent des rendements inférieurs du taux d'extraction d'huile, soient 39,7 %, 47,4% et 56,4%, respectivement, et ce pour la même activité enzymatique (24u/ml). Par ailleurs, dans le cas du tourteau, l'enzyme [CCBS] donne le meilleur rendement d'extraction (soit 58,3 %) (Tableau 2).

En effet, nous avons constaté que le taux d'extraction dépend étroitement de la nature de l'enzyme utilisée et ceci pour les deux matières végétales testées. Il est à noter, que l'utilisation des enzymes combinées a amélioré nettement le taux d'extraction d'huile à partir de la farine de pépin et du tourteau ainsi que la qualité d'huile en acide gras essentiel. Pour la farine de pépin, le meilleur taux d'extraction est obtenu lors de l'utilisation de la combinaison entre l'enzyme [CCBS] et l'enzyme [PL]. Le rendement d'extraction enregistré est de l'ordre de 84,6%.

Tableau 1 : Variation du taux et du rendement d'extraction d'huile à partir de la farine de pépin de figue de barbarie en fonction de l'enzyme exploitée.

Enzyme	Huile (%)	Rendement d'extraction (%)
Enzyme [XCBS]	4.8	61.5
Enzyme [CCBS]	3.7	47.4
Enzyme [XL]	3.1	39.7
Enzyme [PL]	4.4	56.4
Enzyme [XCBS] + [CCBS]	6.2	79.5
Enzyme [XCBS] + [XL]	5.9	74.3
Enzyme [XCBS] + [PL]	6.1	78.2
Enzyme [CCBS] + [PL]	6.6	84.6
Enzyme [PL] + [XL]	6.3	80.7
Presse à froid		<75

Tableau 2 : Variation du taux et du rendement d'extraction d'huile à partir de la farine du tourteau de figue de barbarie en fonction de l'enzyme exploitée.

Nature des enzymes	Huile (%)	Rendement d'extraction (%)
Enzyme [XCBS]	0.66	55
Enzyme [CCBS]	07	58.3
Enzyme [PL]	0.63	52.5
Enzyme [XCBS] + [CCBS]	0.69	57.5
Enzyme [XCBS] + [PL]	0.76	63.3
Enzyme [CCBS] + [PL]	0.78	65
Enzyme [PL] + [XL]	0.63	52.5
[XL] + [XCBS] + [PL]	1.09	91
[XCBS] + [CCBS] +[PL]	0.78	65

Pour le tourteau, le taux d'extraction maximal (1,09%) est obtenu par la combinaison des trois enzymes [XL] , [XCBS] et [PL] correspondant à un rendement d'extraction maximal de l'ordre de 91%. L'utilisation de cette combinaison d'enzymes a montré une amélioration de la teneur en acide oléique mais peu en acide linoléique. Cependant, les autres combinaisons enzymatiques n'ont pas amélioré l'extraction des acides linoléiques et oléiques (Tableaux 3 et 4).

I.1.2 Analyse et identification des acides gras par GC-MS des extraits d'huile obtenue par l'extraction enzymatiques

I.1.2.1 Analyse et identification des acides gras dans les extraits d'huile à partir des graines de figue de barbarie

La composition des extraits huileux des graines de figue de barbarie obtenus par extraction enzymatique est déterminée par la méthode de silylation. Les composées obtenues dans les extraits huileux à partir des graines de figue de barbarie sont représentés dans les tableaux 3 et 4 et sur les figures 1 et 2.

Tableau 3 : Composition de la fraction volatile des graines de figue de barbarie en fonction de la nature de l'enzyme utilisée.

Composés	TR (min)	Super press	Enzyme XCBS	Enzyme CCBS	Enzyme XL	Enzyme PL
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	55,8%	4,79%	-	45,6%	-
Acide Oléique	19,60	10.11%	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 obtenus montrent que les acides gras identifiés dans les quatre extraits obtenus par les différents enzymes utilisées séparément sont les même identifiés dans l'extrait par super press. A titre d'exemple, cinq constituants dans l'extrait obtenu par l'Enzyme XCBS sont identifiés et qui sont : 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%). La meilleure concentration en acide linoléique est obtenue lors de l'utilisation de l'enzyme XL (soit 45,6%) mais avec un faible taux en acide oléique (environ 12,08%) (Tableau 3, Figure1). Ce sont des acides gras doublement insaturés très recherché en produit cosmétique. De même, il est à noter que les extraits d'huile obtenus lors de l'utilisation des deux enzymes XCBS et CCBS (deux enzymes locales) renferment cinq constituants en fraction volatile avec un taux assez important en acide oléique de l'ordre de 45,04% lors de l'utilisation de l'enzyme CCBS et de 49,23% lors de l'utilisation de l'enzyme XCBS mais pauvre en acide linoléique.

Tableau 4 : Composition de la fraction volatile des graines de figue de barbarie en fonction des combinaisons enzymatiques utilisées.

Composés	TR (min)	Enzymes PL+CCBS	Enzymes XCBS+ PL	Enzymes XL+ PL	Enzymes XCBS+CCBS
Acide Palmitique	11,9	21,87%	34,71%	47,91%	24,12%
Acide Linoléique	19,28	26,98%	27,25%	27,69%	23,10
Acide Oléique	19,60	15,73%	18,74%	23,55%	16,7%
Acide Stéarique	21,06	3,78%	5,09%	3,09%	5,12%

Toutefois, l'identification des acides gras extraits par combinaison d'enzymes n'a pas amélioré la richesse en acides gras nobles à double instauration. Par exemple, l'extrait d'huile obtenue par la combinaison des enzymes XL et PL renferme quatre constituants en acide gras avec un taux en acide linoléique de 27,69%, un taux en acide oléique de 23,55%, un taux assez important en acide palmitique **(**47,91%) et un taux en acide stéarique de 3,09% (Tableau 4).

En conclusion, les quatre extraits obtenus suite à la combinaison des enzymes deux à deux sont caractérisés par une richesse en acide oléique (23,55%) mais avec un taux faible en acide linoléique (27.69%) dans le cas de la combinassions des enzymes XL et PL. L'acide palmitique présente le majeur constituant dans la majorité des extraits obtenus (Tableau 4, Figure 1).

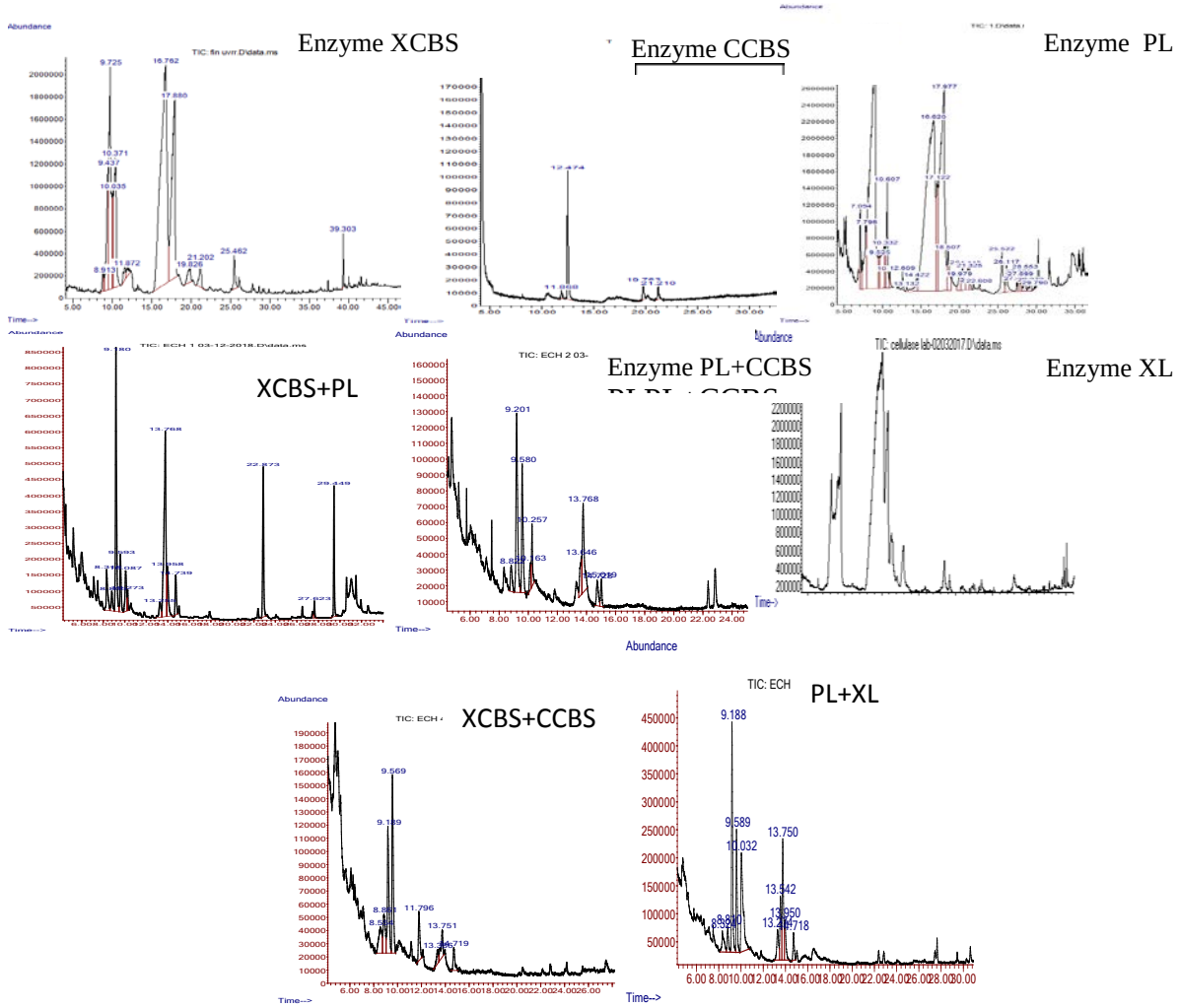


Figure 1: Composition biochimique des différentes fractions d'huiles à partir de pépins de figue de barbarie obtenu par différentes extractions enzymatiques.

I.1.2.2 Analyse et identification des acides gras obtenus dans les extraits d'huile à partir du tourteau 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 est réalisée par CPG et nous a permis d'identifier différents composés d'acide gras dont la composition est illustrée dans les tableaux 5a et 5b et les figures 2 et 3. Les résultats montrent que les acides gras identifiés dans les différents extraits enzymatiques sont les même. L'utilisation de la combinaison d'enzymes [CCBS] et [PL] permet d'améliorer légèrement le taux d'extraction des huiles avec un enrichissement en acide linoléique. L'utilisation des enzymes [CCBS] et [PL] combinées permet une amélioration de la teneur en acide oléique (48,96%) mais peu en acide linoléique. Cependant, les trois autres combinaisons enzymatiques n'ont pas amélioré l'extraction des acides linoléiques et oléiques. Par ailleurs, la combinaison des trois enzymes [XL], [XCBS] et

[PL] améliore nettement le taux d'extraction pour atteindre 91,1% avec un enrichissement en acide linoléique de 55,16% (Tableaux 5a et 5b, Figure 3).

Tableau 5a : Composition de la fraction volatile des extraits d'huile à partir du tourteau de figue de barbarie : utilisation des enzymes séparées

Acide Gras	TR	Enzyme CCBS	Enzyme XCBS	Enzyme XL	Enzyme PL
Acide myristique	7.88	5.04	4.18	4.01	3.11
Acide palmitique	12.75	32.74	23.36	28.01	20.62
Acide linoléique	18.7	25.39	31.68	29.1	33.59
Acide oléique	19.21	27.41	31.15	27.15	29.43
Acide stéarique	20.5	7.72	7.41	7.87	6.38

Tableau 5b : Composition de la fraction volatile des extraits d'huile à partir du tourteau de figue de barbarie : utilisation des Enzymes combinées

Acide Gras	Enzyme [XCBS]+ [XL]	Enzyme [XCBS]+ [PL]	Enzyme [CCBS]+ [PL]	Enzyme [PL]+ [XL]	[XL] +[XCBS]+ [PL]	[XL+[XCBS] + [PL]
Acide myristique	9.54	-	1.1	-	1.77	11.0
Acide palmitique	37.87	23.36	18.79	10.43	20.5	26.5
Acide linoléique	24.49	31.68	48.96	17.88	55.16	22.8
Acide oléique	10.66	31.15	22.77	35.68	23.3	27.6
Acide stéarique	-	7.41	3.85	1.8	3.31	6.78

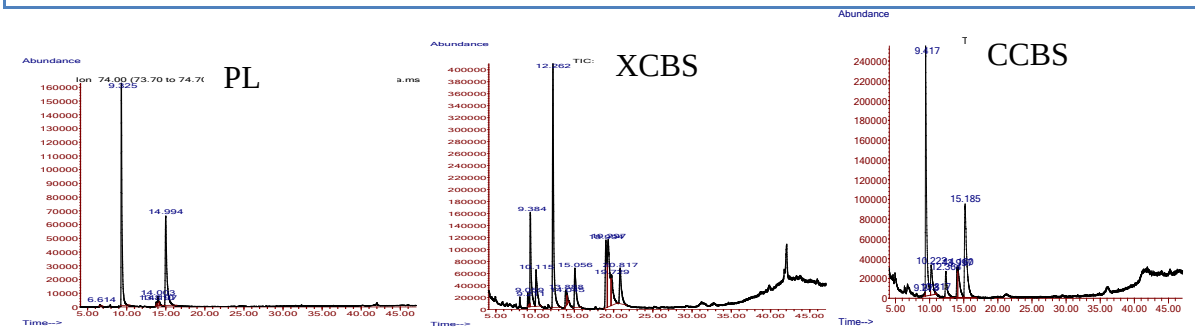


Figure 2 : Composition biochimique des huiles obtenues à partir des extraits du tourteau de figue de barbarie : enzymes séparées**.**

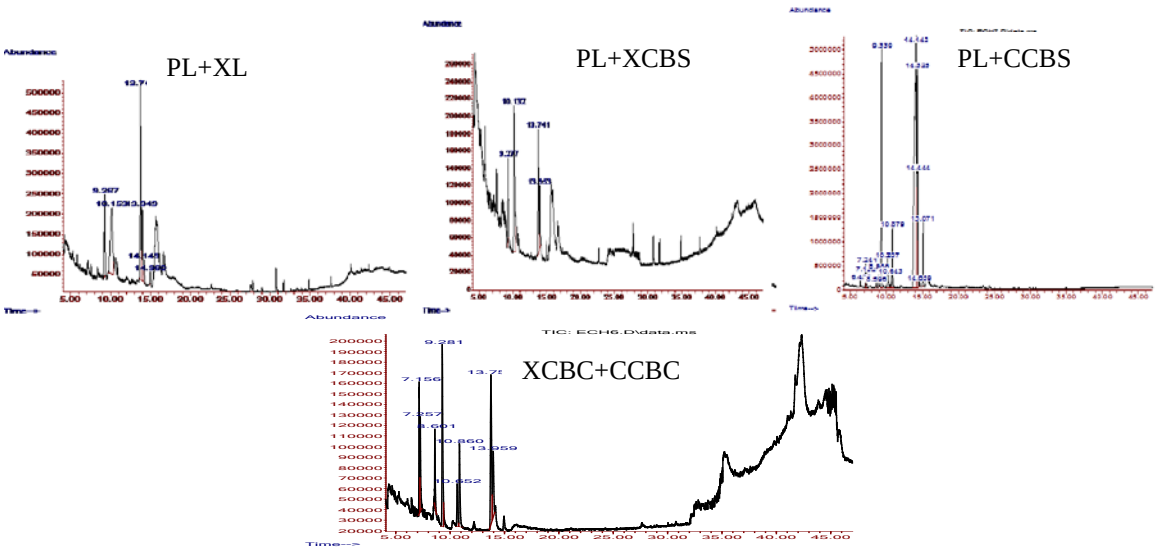


Figure 3 : Composition biochimique des huiles obtenues à partir des extraits du tourteau de figue de barbarie : enzymes combinées**.**

I.1.3. Optimisation de l'extraction enzymatique

En général, les paramètres répertoriés qui influent sur le rendement de l'extraction de l'huiles sont : le temps, la température, le rapport matières végétales/enzymes, le rapport 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. 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 (au bout de 6 heures) à une température de 50°C lors de l'utilisation des enzymes [XCBS] et [CCBS] séparées. Par ailleurs, lors de l'utilisation des enzymes combinées, le meilleur rendement est obtenu à une température de 50 °C après 8 heures d'incubation. L'optimisation de la température d'incubation a montré que les enzymes locales produites au CBS possèdent une activité maximale à une température égale à 50°C qui se traduit par un taux d'extraction maximal de l'huile. Les courbes présentées sur la figure 4 ont toutes un profil similaire. Toutes les enzymes ont une action rapide dans les premiers 6 heures de la réaction qui se traduit par une augmentation du rendement d'huile extraite, puis une stabilité est observée. Cela est peut-être dû à une dénaturation des enzymes et par conséquent une baisse de leur activité suite à un traitement thermique prolongé.

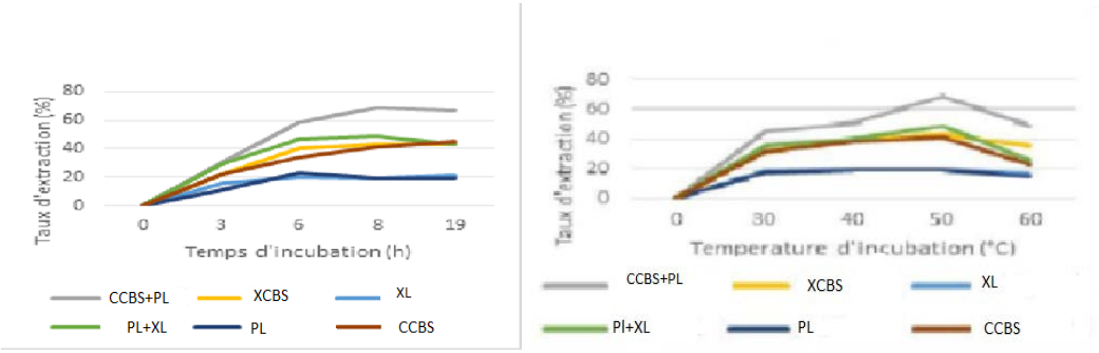


Figure 4 : Optimisation des conditions opératoires (temps/température) de l'extraction enzymatique de l'huile.

I.1.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'huile par test de piégeage des radicaux DPPH

L'évaluation de l'activité anti radicalaire de l'huile extraite par deux enzymes dans le cas de la farine des graines de figue de barbarie et par trois enzymes dans le cas du tourteau de figue de barbarie est réalisée par le test DPPH (Figure 5). Les résultats obtenus ont montré que l'huile obtenue par extraction enzymatique possède une activité anti-oxydante ce qui explique la présence des composés phénoliques qui sont par contre absents dans l'huile obtenue par presse à froid**.**

Une activité anti radicalaire est mesurée dans les extraits huileux obtenus par ASE, presse à froid et extraction enzymatique. L'huile obtenue par ASE et extraction enzymatique ont montré des activités proches alors que l'huile obtenue par presse à froid ne possède aucune activité anti radicalaire par le DPPH. Le pourcentage maximal d'inhibition est atteint à 100 µg/ml.

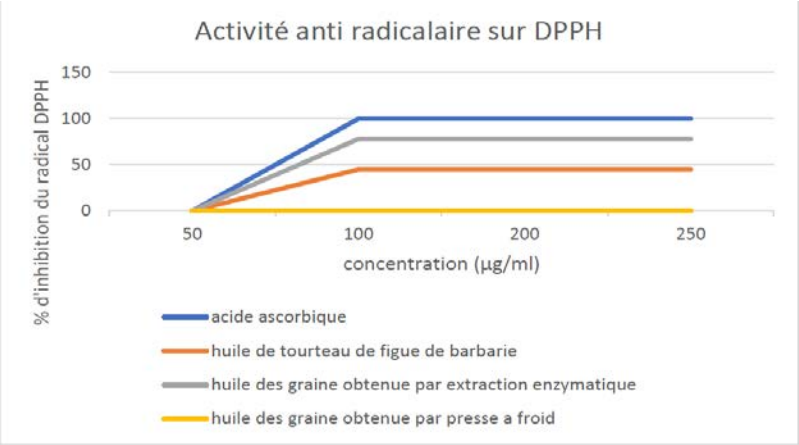


Figure 5 : Evaluation de l'activité anti radicalaire des fractions huileuses obtenues par extraction enzymatique.

Références

[1] Ramadan M.F., Mörsel, J. -T., (2003). Oil cactus pear (Opuntia ficus-indica L.). Food Chem. 82,339–345.

[2] Matsuhiro, B.Lillo, L.E., Saez, C.c, Zarate, O (2006). Chemical characterization of the mucilage from fruit of Opunta ficus indica. Carbyhydrate polymers 63, 263-267.

[3] Habibbi, Y., heyraud, A., Mahrouz, M., Vignon, M., R., (2004). Structural features of pectic-polyssacharides from the skin of Opunta ficus indica prickly pear fruits. Carbyhydrate research., 339-119-127.

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

Les réactions d'oxydation dans divers produits gras (agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, lubrifiants, etc.) nuisent fréquemment aux qualités de ces derniers et sont alors dépréciés.

Sous les effets de certains facteurs tels que l'oxygène atmosphérique et la température, ces produits s'oxydent en devenant notamment rances, visqueux, de couleur foncée et donc impropres quant à leurs usages. Il y a de plus en plus d'intérêt à l'utilisation des antioxydants naturels comme des composants bioactifs dans les aliments. La recherche de nouveaux antioxydants à partir de matières végétales a fait l'objet d'une attention toute particulière au cours de la dernière décennie. De nombreux groupes de recherche se sont concentrés sur l'extraction d'antioxydants à partir de plantes et de sous-produits agro-industriels, plaçant ce sujet à l'avant-garde de la recherche. Le Laboratoire LBPE a développé à petite échelle un procédé de production des antioxydants à partir des feuilles d'olives. Le procédé d'extraction des antioxydants à partir de plantes végétales nécessite des étapes d'extraction, de concentration et de purification. Toutes les étapes de production des antioxydants sont bien étudiées à l'heure actuelle à l'échelle laboratoire. Au niveau de l'unité (US), un programme de recherche-développement sur la valorisation technologique et le transfert des antioxydants dans des produits alimentaires nous a été confié pour son développement à l'échelle pilote visant la mise au point d'un procédé d'extraction des antioxydants à partir de plantes végétales. Ce procédé nécessite des étapes d'extraction, de séparation par l'application de la technologie membranaire et de concentration sous vide par rotavap. Toutes les opérations unitaires d'extraction, de séparation et de purification sont étudiées à l'heure actuelle à l'échelle pilote. Les extraits produits à grandes échelle sont ensuite transférés à la Société Agromed, en tant que partenaire au projet et est intéressée par l'utilisation de Biomolécules actives élaborés au CBS, essentiellement 'les antioxydants naturels' dans des produits laitiers riches en matières grasses dans l'objectif d'éviter les réactions d'oxydation, d'empêcher les contaminations par des bactéries et de retarder le vieillissement des produits ainsi qu'une éventuelle utilisation des

produits obtenus en tant que « novel food » riches en antioxydants.
Dans cette étude, notre groupe de travail a entamé des recherches d'enrichissement assistée dans la gamme des produits YAB afin de valoriser les extraits des polyphénols produits à l'US et de faciliter sa mise en place pour les producteurs de produits laitiers. L'avantage de ces extraits c'est qu'ils sont stables et facilement solubles dans les solutions aqueuses et lipidiques. L'activité antioxydante des extraits des feuilles d'olivier est due à la présence de ce composé. L'oleuropéine serait plus efficace que le tyrosol mais restait moins efficace que l'hydroxytyrosol et l'acide caféique. Pour cela, des essais de la bioconversion enzymatique de l'oleuropéine en hydroxytyrosol sont réalisés à l'US et des extraits riches en hydroxytyrosol sont transférés à la société AGROMED. L'enrichissement des produits laitiers avec les extraits des feuilles d'olivier et de l'hydroxythyrosol a été fait sur site industriel. L'extrait concentré, est partiellement dissout dans la cuve de malaxage du produit à une température de l'ordre de 47°C. Il est à signaler, que nous avons appliqué cette méthode d'enrichissement direct des produits laitiers avec les extraits des polyphénols en batch dans une cuve de malaxage de capacité totale 500 litres. Plusieurs produits de la gamme des produits YAB riches en lipides à savoir le Mio, le Flan et le yaourt étuvé ont été imprégnés de l'hydroxytyrosol ou de l'oleuropeine pour faire face à la peroxydation lipidique. L'évaluation du potentiel antioxydant dans l'aliment est faite par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres. Les résultats obtenus de cette étude ont montré que l'utilisation de l'un des extraits dans la gamme des produits YAB a amélioré nettement la stabilité des produits testés. Cependant, l'utilisation de l'hydroxytyrosol dans les produits laitiers testés était plus efficace que l'oleuropéine à la même concentration utilisée. Le potentiel antioxydant à piéger les radicaux libres de l'hydroxytyrosol était plus fort que celui de l'oleuropéine et ceci pour les trois produits laitiers testés. Il est à noter, que le potentiel antioxydant, des deux extraits utilisées est stable dans les produits en fonction du temps de stockage (40 jours), ceci pour les trois produits laitiers utilisés. A des concentrations optimale des extraits, les tests sensoriels sont trop satisfaisants (pas d'effet négatif ni sur le gout ni sur la texture et la couleur des produits testés). Les résultats obtenus suite à l'étude d'optimisation de la concertation des extraits imprégnés dans la gamme des produits YAB ainsi que les tests sensoriels réalisés restent confidentiels. Cette étude est également complétée par des analyses bactériennes pour montrer l'efficacité des extraits dans la décontamination microbienne des produits.

<u>Activité 3:</u> Prestation de services pour les différents laboratoires de recherche du CBS, le monde académiques et le tissu socioéconomique

<u>II1.1. Prestation de services pour les différents laboratoires du CBS durant l'an 2018</u>

L'Unité de Valorisation des Résultats de la recherche (US) assure entre autre une assistance aux différents laboratoires du CBS dans la réalisation d'expériences de fermentation, de séparation et d'analyses. Citons par exemple:

- Séchage par lyophilisation des solutions protéiques, enzymatiques et de micro-organismes.
- Concentration par la technique d'évaporation sous vide.
- Application des procédés membranaires à savoir la MF et l'UF pour la séparation et la purification de biomasses, de biomolécules et autres.
- Réalisation de cultures de micro-organismes par fermentation en mode batch et batch-alimenté ;
- Analyses divers à savoir : détermination de l'activité d'eau des produits solides par AW mètre, dosage de l'azote (organique et minéral) par la méthode de Kjeldahl (minéralisation, distillation, dosage), mesure spectral UV-visible et autres.

Le nombre total de fermentation, des opérations unitaires de broyage, de séparation, de

concentration, de séchage et d'analyses (à savoir dosage d'azote, mesure spectral UV-visible) réalisées durant l'an 2018 pour le compte des laboratoires du CBS est détaillé dans les tableaux 6 et 7.

Tableau 6: Nombre total de fermentation, volumes totaux préparés et la durée totale d'incubation réalisés au cours de l'an 2018 pour le compte des laboratoires du CBS

Laboratoire	Nombre de fermentation (par an)	Volume total (L)	Durée totale d'incubation (jours)
LB Pest	4	114	19
LBME	2	18	21
LBMIE	5	73	21
LBPE	3	73	12
LMB	1	10	6
LPCMC	1	10	3
Total général	**16**	**298**	**82**

Tableau 7 : Prestations de services de séparation, concentration, séchage et autres sées au cours l'an 2018 pour le compte des laboratoires du CBS

Laboratoire	Séparation/concentration	Broyage/ séchage	Analyses
LBMIE	4	20	12
LBPE	03	48	210
LMB	00	09	23
LB Pest	05	26	03
LBME	24	25	22
LPCMC	04	03	00
Total général	40	131	270

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

L'unité spécialisée (US) a assuré également une assistance aux autres établissements et au tissu socio-économique dans la réalisation d'analyses et d'opérations unitaires dont l'unité dispose. Citons par exemple:

- Séchage par lyophilisation ;
- Analyse physicochimique (salinité) et biochimique (dosage d'activité enzymatique)

Les principales prestations de service réalisées, pour le compte de certaines institutions nationales (la Faculté des Sciences de Sfax et le Centre de Recherche et des Technologies d'Energie (CRTEn)) ainsi que certaines industries (Next protein et AGROMED) sont les suivantes :

- Réalisation de trois cycles de lyophilisation de solutions agroalimentaires pour le compte du Laboratoire « Maîtrise de l'Energie Eolienne et de Valorisation énergétique des déchets » du CRTEn.
- Analyses physico-chimiques et microbiologiques : détermination de la salinité et le dosage d'activité enzymatique dans des produits laitiers pour le compte de la société AGROMED.
- Réalisation de 11 cycles de lyophilisation de solutions agroalimentaires pour le compte du Laboratoire « Maîtrise de l'Energie Eolienne et de Valorisation énergétique des déchets » du CRTEn.

Service d'Analyse

LISTE DES MEMBRES DU SERVICE ANALYSES :

Nom et prénom	Grade
Mme Fatma REZGUI	**RESPONSABLE DU SERVICE ANALYSES jusqu'à Juillet 2018** Ingénieur Principal
Mme Najla MASMOUDI	Ingénieur Principal
Mlle Lobna JLAIEL	Technicien Principal et **Responsable du Service Analyses depuis Août 2018**
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**

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 2018

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

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

TYPE D'ANALYSE	NOMBRE DES ANALYSES EFFECTUEES EN 2017
GC/MS	209
HPLC	362
FPLC	282
SEQUENCEUR 4 CAPILLAIRES	672
SEQUENCEUR MISEQ	14 RUNS
NANODROP	684
QPCR	263
QUBIT	12
BIOANALYSEUR	136
VARIOSKAN	92
TOTAL = 2726	

✓ PRESTATIONS DE SERVICES

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	114
PARACHIMIC	GC/MS	1
ENIS	GC/MS	4
EOLE SUPERIEURE DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES TUNIS	HPLC	16
CENTRE REGIONEL DE RECHERCE EN AGRICULTUR	GC/MS	1
TOTAL = 136		

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.