MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Centre de Biotechnologie de Sfax

RAPPORT D'ACTIVITES

DU CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE DE SFAX « CBS »

ANNEE 2019

RA / CBS. 2019

TABLE DES MATIERES

1- Message du Directeur Général 1

2- Présentation générale du CBS 2

3- Effectif du CBS 2

4- Liste des Enseignants Chercheurs / Ingénieurs du CBS 2

5- Membres du Conseil Scientifique 4

6- Budget du CBS 4

7- Equipements lourds du CBS 5

8- Service maintenance 5

9- Coopération Internationale 7

10- Ouverture sur l'environnement national 8

11- Ouverture sur l'environnement international 10

12- Production Scientifique 14

13- Séminaires, journées et ateliers scientifiques 14

14- Prix et distinctions 15

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

- LR15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) 16
- LR15CBS02 : Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes (LBME) 30
- LR15CBS03 : Laboratoire des Biopesticides (LB) 50
- LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes (LBAP) 60
- LR15CBS05 : Laboratoire de Microorganismes et Biomolécules (LMB) 74
- LR15CBS06 : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) 87
- LR15CBS07 : Laboratoire de Procédés de Criblage Moléculaire et Cellulaire (LPCMC) 99
- US15CBS01 : Unité Spécialisée, Valorisation des Résultats de Recherches (UVRR) 109
- Service Analyse 118

Message du Directeur Général

En 2019, le CBS se trouvait d'ores et déjà à la fin de son contrat programme (2015-2018) et à l'aube du nouveau contrat programme 2019-2022, officiellement approuvé par le ministère de tutelle en Décembre 2019. C'est à travers ses différentes structures que le CBS a:

- Exploré de nouveaux projets et partenariats en renforçant d'avantage son réseau de coopération internationale (plus de 30 projets internationaux)
- Renforcé son expertise dans le domaine des biotechnologies via la signature d'une vingtaine de conventions avec son milieu socio-économique national et international
- Assuré une production scientifique très respectable (plus d'une centaine de publications/an et cinquantaine de brevets)
- Mérité 3 prix présidentiels
- Démontré son engagement à maintenir son SMQ pour sa 3ème Année.

De plus, et afin d'améliorer en continue les performances de son système managérial et organisationnel, le CBS, à travers son projet PAQ CR 2S a opté pour un Système de Managent Intégré Qualité-Sécurité-Environnement SMI-QSE et passé à l'accréditation de quelques paramètres anlytiques 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 et au fil des années, 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 continuera à jouer le 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 à l'international.

J'espère transmettre ma vision à l'ensemble de la famille du CBS et ce par le renforcement de : la transparence ; l'imputabilité ; la qualité du service et l'engagement. Ainsi, la priorité sera accordée durant le nouveau Contrat Programme 2019-2022 aux 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

Prof. Slim TOUNSI

1. Présentation générale du CBS :

Le Centre de Biotechnologie de Sfax « CBS » 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 ».

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

Ce rapport d'activités récapitule toutes les activités de RDI et VTT des différentes structures du CBS durant l'année 2019. 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 ».

2. Effectif du CBS :

Année	2019
Enseignants Chercheurs	46
Ingénieurs	16
Corps Technique	38
Administratifs + ouvriers	37
Effectif Total	**137**

Jeunes chercheurs	2019
Chercheurs Postdoc sous contrat CBS	63
Etudiants en thèse	66
Etudiants en mastère	3
Effectif Total	**132**

3. Liste des Enseignants Chercheurs et Ingénieurs du CBS

Nom et Prénom	Position
Slim Tounsi	Professeur / Directeur Général du CBS /
Samir Bejar	Professeur
Ali Faouzi Gargouri	Professeur
Raja Mokdad	Professeur/ Directeur d'un laboratoire
Ahmed Rebaï	Professeur
Lotfi Mellouli	Professeur
Sabeur Masmoudi	Professeur/ Directeur d'un laboratoire
Mohamed Sami Aïfa	Professeur
Mohamed Chamkha	Professeur/ Directeur d'un laboratoire
Souad Rouis	Professeur/ Directeur d'un laboratoire

Mamdouh Ben Ali	Professeur/ Directeur d'un laboratoire
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 en chef
Bochra Mellouli	Ingénieur principal
Riadh Ben Marzouk	Ingénieur Principal
Monia Blibech	Ingénieur en chef
Aïda Koubaa	Ingénieur Principal
Hekma Ayadi	Ingénieur Principal
Mounir Bouattour	Ingénieur Principal
Malika Ayadi	Ingénieur Principal
Abdallah Choura	Ingénieur Principal

NB : Le CBS compte aussi : **30** techniciens; **01** Préparateur et **07** agents techniques

4. Membres du Conseil Scientifique du CBS

- Slim Tounsi — Directeur Général du CBS
- Abdallah choura — Secrétaire général et rapporteur
- Ali Gargouri — Directeur de laboratoire, Membre
- Faical Brini — 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, Directeur de laboratoire par Intérim
- 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 2019

Budget provenant du Ministère en DT	Titre I: 549.000,000 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): 110.000,000 DT
	Titre II (VRR): 38.620,000 DT
	Titre II (PAQ) :235.320,000 DT
Secteur économique	115.838,806 DT
Coopération internationale: 1/Projets multilatéraux * 2/ Projets bilatéraux**	 189.975,030 DT 104.000,000 DT
Coopération internationale (Total)	293.975,030 DT
Total ressources propres (Secteur économique + Coopération internationale)	409.813,836 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 2019, 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 équipements scientifiques
- 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 et la réduction de consommation.
- Lancement des consultations relatifs à l'entretien des infrastructures (Génie civil – peinture – parking – chaussée)

Métrologie :

Le CBS a créé un comité de métrologie piloté par Mr. Mounir BOUATTOUR, pilote processus Maintenance Equipements et Infrastructures (MEI). A l'état actuel, ce comité est composé de 13 membres qui sont les représentants des laboratoires de recherche, de l'unité Analyse, de l'unité UVRR , chargé d'équipements scientifiques du CBS, et de la cellule qualité.

L'objectif de ce comité est de fonder la fonction métrologie au CBS et d'assurer la conformité métrologique des instruments de mesure.

Les référents métrologie ont montré leur assiduité régulière et leur compétence en assurant les différentes activités de métrologie. Afin de renforcer leurs connaissances et compétences, les référents métrologie ont bénéficié de quelques formations théoriques et pratiques organisées par le CBS sur la métrologie de masse, volume et température, ainsi que le calcul d'incertitude et la validation des méthodes d'analyses (depuis l'année 2017).

Depuis la création du comité, la cellule qualité en collaboration avec le responsable du service MEI ont veillé à l'acquisition des masses étalon et du matériel nécessaire pour la vérification en interne du parc de pesage, de volume et de la température, au raccordement aux étalons nationaux, à l'étalonnage des équipements de mesure par un prestataire externe accrédité et sur la rédaction, ainsi que la diffusion des procédures qualité pour la bonne gestion des parcs de pesage, de volume et de la température.

Les référents métrologie du CBS ont assuré la mise à jour, la vérification en interne de leurs équipements et instruments de mesure pour déclarer le déclassement, la mise au rebut et le retrait de l'inventaire de tout matériel de mesure obsolète ou inutile.

En 2019, le CBS via son comité de métrologie a participé au prix national de métrologie organisé par l'Agence Nationale de Métrologie (ANM). Ainsi, le 1 er octobre 2019, la fonction métrologie au CBS a été évaluée par un comité du concours national de métrologie, formé par des représentants de différents ministères.

Le Comité de métrologie du CBS a participé au développement de la vision nationale de la métrologie en Tunisie (vision métrologie 2030) via l'envoi à l'ANM de l'état des lieux.

Dans le cadre du nouveau contrat programme du CBS (2019-2022), le comité Métrologie va être reconstitué. Il va jouer un rôle très important en collaboration avec l'unité QSE-Accréditation nouvellement créée pour le programme de la mise en place du système intégré QSE et l'Accréditation de quelques paramètres d'analyse pour les années 2020-2022.

8. Coopération Internationale

Type de la Coopération	Nombre de Projets en 2019
Multilatérale	**14**
Bilatérale	**8**
Avec un Organisme International	**2**

a/ Coopération Multilatérale

Durant l'année 2019, Le CBS a été impliqué dans cinq nouveaux projets de coopération multilatérale :

- Un projet **ARIMnet 2 :D4Declic** dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed.
- Deux projets **EU-PRIMA : EXPLOWHEAT et IMPRESA**
- Un projet **UE/ H2020 Widespread Twinnig 03-2018: SEED**
- Un projet **ENI CBC MED Programme: CEOMED**

Par ailleurs, il a continué à entretenir 9 projets actifs depuis 2016 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 ».
- ✓ Deux projets **ARIMnet 2 :** dans le cadre de la coopération Tuniso-Euromed
- ✓ Le projet Tuniso-Japonnais **SATREPS**.
- ✓ le projet **LMI COSYS-Med** sous tutelle de l'IRD

b/ Coopération Bilatérale

Durant l'année 2019, le CBS a été impliqué dans deux nouveaux projets de coopération bilatérale :

- 1 projet dans le cadre de la Coopération bilatérale scientifique et Technique **Tuniso-Coréenne**
- 1 projet **i-COOP 2019** dans le cadre de coopération Tuniso-Espagnole

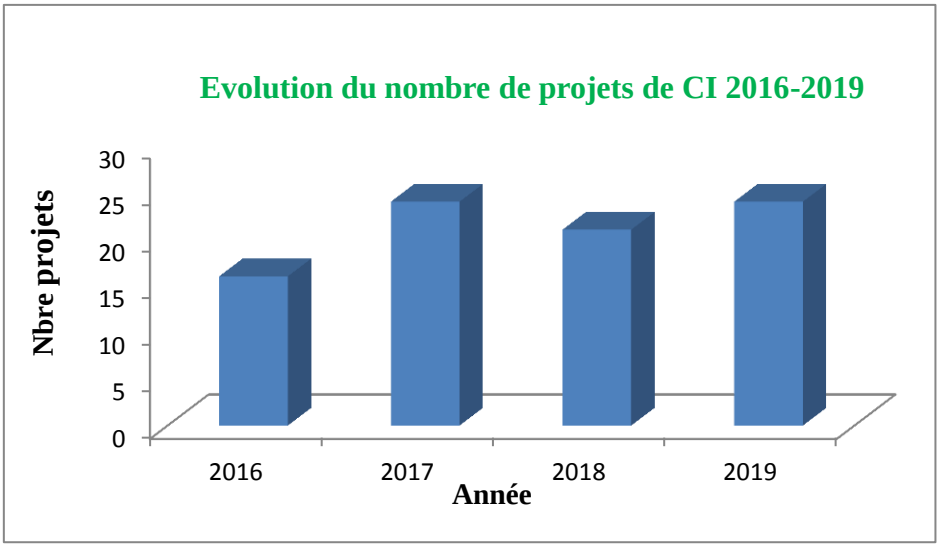
En parallèle, le CBS a continué à entretenir six autres projets dans le cadre de cooperation bilatérale dont :

- ✓ 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**
- ✓ 2projets **PHC-UTIQUE** dans le cadre de la coopération universitaire Tuniso-Française.

c/ Organismes internationaux

Durant l'année 2019, le CBS a continué d'entretenir deux projets avec des organismes internationaux dont :

- ✓ Un Projet Américain PEER financé par **USAID**:
- ✓ Un projet financé par the International Foundation for Sciences **IFS**.



9. Ouverture du CBS sur son environnement national

Durant l'année 2019, le CBS a noué une nouvelle convention avec L'Industrie **PHILADELPHIA PHARMA** et a continué ses collaborations avec les partenaires socio-économiques suivants : 1/ Société industrielle : Jmal **« EJM »** pour les produits d'entretien 2/ Société **SEED** et 3/ la Société **SOTULUB** 4/ Laboratoires **Medi**

Par ailleurs, il a signé et a renouvelé un bon nombre de conventions avec des partenaires universitaires, socio-économiques ainsi qu'avec l'ANPR dans le cadre des programmes suivants :

Programme Mobidoc Post –Doc et Doctorants

1/MOBIDOC-POSTDOC 1 : «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». *Bénéficiaire : la Société Industriel VITALAG*

2/ MOBIDOC-POSTDOC 2 : «Etude microbiologique, biochimique et physico-chimique de l'instabilité du lait UHT de la marque VITALAIT et installation d'un modèle prédictif de contrôle». *Bénéficiaire :la Centrale Laitière de Mahdia VITALAIT*

3/MOBIDOC-POSTDOC 3 : «Fabrication de nouvelles gammes de cafés aromatisés et à base de noyaux de dattes». *Bénéficière : la société Tunisienne de Production des Produits Alimentaires STPPA*

4/MOBIDOC-POSTDOC 4 : «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». *Bénéficiaire : la Société Industrielle le Bon Gout*

5/MOBIDOC-POSTDOC5 : «Incorporation des polysaccharides et des probiotiques dans la crème et les produits de pâtisserie : Effet sur la qualité des produits reformulés». *Bénéficiaire : la Société Industrielle Souad Gourmandise*

6/ MOBIDOC-POSTDOC6 : « Valorisation agronomique du phosphogypse par culture des plantes médicinales sur phosphogypse et suivi des concentrations des métaux lourds dans les huiles essentielles de ces plantes et dans le phosphogypse. *Bénéficiaire: Tunisian Indian Fertilizers, Usine TIFERT site de Skhira-Sfax.*

7/ MOBIDOC-POSTDOC7: Production des molécules bioactives à partir des sous-produits d'olivier pour prévenir la maladie de diabète type-2 et l'obésité. Utilisation des procédés d'encapsulation et de compression Spécialisée dans la production de compléments alimentaires. *Bénéficiaire «PhytoPLANT »*

8/Continuation MOBIDOC-POSTDOC8 i : « Monter une Start-up Production d'enzymes écologiques destinées pour les industries de cuir, de textile, de détergence et d'agro-alimentaire ». *Bénéficiaire: « Biotech ECOZYM »:*

9/Continuation MOBIDOC-POSTDOC9: « Production et incorporation d'un cocktail d'enzymes microbiennes (protéases, amylases et peroxydases) dans la formulation du produit de détergent Class ». *Bénéficiaire:la Société de détergence JMAL « EJM »***.**

10/ MOBIDOC- DOCTORANTS : « Elaboration d'un complexe enzymatique destiné pour la panification afin d'améliorer les propriétés de transformation de la pâte ». *Bénéficiaire : la Société Meunière Tunisienne*

Pogramme de financement de l'innovation

Le CBS a aussi continué de bénéficier de financements du MESRS dans le cadre de programmes de financement de l'innovation (6 PRF et 1 VRR) :

1- **Projet PRF***:* « Développement d'un éco-procédé pilote de culture de micro-algues pour la séquestration de carbone, le traitement des eaux usées et la production de biocarburant. » Le LBPE est l'équipe coordinatrice.

2- **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. » Le LBPE est une équipe partenaire.

3- **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. »En collaboration avec Pr Monem Kallel

4- **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. » En collaboration avec Pr Ahmed Mliki

5- **Projet PRF** :'PBMLT': « Plateforme Biométrique Multimodale de Prévention contre le Terrorisme' »

6- **Projet PRF** :'PARADIS': « Plateforme Big Data pour les allergies alimentaires en Tunisie. »

7- **Projet VRR: «** Valorisation de sous-produits de l'industrie oléicole par la production d'antioxydants et de biogaz vers une application industrielle à Sidi Bouzid. ». Projet avec la Société AGRITEX, Sidi Bouzid.

Programme d'Encouragement des Jeunes Chercheurs PEJC

En cours de 2019, 8 projets de PEJC ont été acceptés et/ou renouvelés :

1/Titre : « Nettoyage des Biofilms contaminants les industries agroalimentaires par approche biotechnologique (NBCIAAB) ». (**Coordinateur: Dr Sami Mnif**)

2/ Titre du projet : «Tunisian oral microbian profile in vestigation in Anty coronary syndrom ». (**Coordinateur: Dr Najla Kharrat**)

3/ Titre du projet: « A new dietry formulation for aquacultured fish in Tunisia ». (**Coordinateur: Dr Dorra Driss**)

4/ Titre du projet : **«**Caractérisation biochimique et moléculaire de nouvelles peroxydases microbiennes d'intérêt industriel dans la valorisation et la dégradation de la lignine**». (Coordinateur : Dr. Nadia Zarai Jaouadi)**

5/ Titre du projet : **«**Les cyclodextrines comme vecteurs d'encapsulation des molécules bioactives : Production, purification et génération des nanoparticules **». (Coordinateur: Dr Sonia Jemli)**

6/ Titre du projet : « Dissection des réseaux de régulation du gène AlSRG1 isolé à partir d'Aeluropus littoralis liés aux stress abiotiques via une approche transcriptomique : RNA-seq **». (Coordinateur : Dr Rania Ben Saad).**

7/ Titre du projet : « Bioconversion des déchets industriels en lipides microbiens à usage chimique et énergétique ». **(Coordinateur : Dr Mohamed Guerfali)**

8/ Titre du projet : « Intérêt de l'étude de la clonalité lymphocytaire par réarrangements géniques dans le diagnostic et le suivi des hémopathies lymphoïdes malignes ». **(Coordinateur : Dr Rania Ben Saad).**

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

En 2019, le CBS a bénéficié d'un projet **PAQ-Gouvernance et capacité de gestion (PAQ CR 2S) Système Management intégré Qualité sécurité environnement & Accréditation et d'un projet PAQ-PAES** qui consiste à une société prestataire de services spécialisée en analyse génétique et en édition génomique des organismes modèles.

Par ailleurs, il a continué ses 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 et le **PAQ-Post PFE** : Projet pour la valorisation des PFE innovants.

1. ***PAQ-Gouvernance et capacité de gestion (PAQ CR 2S)***

Système Management intégré Qualité sécurité environnement & Accréditation

Acronyme : SMI QSE &Accréditation

Allocation : 220.000 DT

Durée : 18 mois

Dans le cadre de sa démarche qualité et afin d'améliorer en continue les performances de son système managérial et organisationnel, le CBS, dans une 1ère étape, a bénéficié d'une avance de l'allocation de l'ordre de 30000 DT suite à l'acceptation de la Note Conceptuelle « NC » du projet **SMI-QSE&ACCREDITATION**.

A cet effet, le CBS via son comité de pilotage du projet a développé ses plans d'orientation et action stratégiques (POS et PAS), ainsi qu'un plan de communication autour du projet. Dans le cadre de la NC, un diagnostic par rapport aux exigences des normes qualité, sécurité environnement et Accréditation ont été réalisé. Il a organisé également des journées de sensibilisation et de formation sur les exigences des normes **ISO 45001/2018**, **ISO 14001/2015** et ISO **17025/2017** au profit de son personnel de recherche, technique et administratif.

Afin de garantir en continue la pérennisation de sa démarche qualité, trois personnes ressources, membres du comité de pilotage du projet, ont suivi avec réussite la formation certifiante Auditeur tierce partie IRCA ISO 9001/2015.

Suite aux journées d'assistance techniques organisées par le MESRS, le CBS a déposé sa proposition complète de son projet SMI-QSE &Accréditation pour la mise en place et la mise en œuvre de son système de management intégré (QSE) et Accréditation.

2. ***PAQ PAES***

Le projet « **PAQ - Pré-Amorçage et Essaimage Scientifique** » du CBS a pour objectif l'exploitation des résultats innovants de la recherche en vue de la création de Spin-offs »

Il permet l'appui et l'accompagnement du post doc à deux niveaux technique (valider et démontrer la faisabilité de la technologie en environnement réel) et entrepreneurial:

Le projet PAQ PAS du CBS est intitulé « **Projet société prestataire de service spécialisée en analyse génétique et en édition génomique des organismes modèles** »

Durée : 18 mois

Budget : 100.000 DT

Bourse mensuelle/ Post-doctorant : 1000 DT par mois

10.Ouverture du CBS sur son environnement international

A l'échelle internationale, le CBS a noué une nouvelle convention de coopération avec l'université de/ Selcuk University-Konya-Turkey et a continué sa collaboration avec l'université de Sapienza de Rome –Italie 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 2019:

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Adel takeri	Tuniso / Indien	Inde	Du 17 au 27 janvier
Souaad rouis	Citrus	Italie	Du 27 janvier au 07 février

Raida zribi	LB	Danemark	Du 27 janvier au 02 février
Souaad rouis	Citrus	Liban	Du 25 février au 26 Mars
Fatma Idriss	Citrus	Liban	Du 01 au 12 mars
Wafa jalouli	Citrus	Liban	Du 11 au 21 mars
Souaad rouis	Citrus	Italie	Du 04 au 15 avril
Abdallah choura	CBS	Liban	Du 08 au 12 avril
Sami mnif	Marroc	France	Du 23 au 27 avril
Fatma karray	LMI cosysmed	Maroc	Du 23 avril au 04 mai
Mariem ellouze	ARIMNET	Turquie	Du 23 au 28 avril
Salim tounsi	LB	Croatie	Du 31 mars au 04 avril
Ahmed rebai	LPCMC	Espagne	Du 06 au 10 mai
Slim tounsi	LB	Italie	Du 20 au 23 mai
Raja Gargouri	LBME	France	Du 03 au 07 juin
Mohamed guerfali	LBME	France	Du 03 au 07 juin
Ahmed rebaai	LPCMC	Kenia	Du 12 au 15 juin
Raida Zribi	LB	France	Du 23 au 27 juin
Sonia khoufi	ERANET MED	France	Du 01 au 05 juillet
Fathi aloui	ERANET MED	France	Du 01 au 05 juillet
Olfa frikha	Tuniso/indien	Italie	Du 08 au 12 juillet
Bassem jaouadi	LBMIE	Algérie	Du 21 au 27 juillet
Nizha abid	ARIMNET	France	Du 29 au 04 septembre
Souaad rouis	Citrus	Allemagne	Du 09 au 12 mai
Souad Rouis	Citrus	Allemagne	Du 25 au 28 septembre
Slim tounsi	LB	France	Du 28 au 28 septembre
Bassem jaouadi	LBMIE	Algérie	Du 29 septembre au 08 octobre

Moncef msadak	PHC-Utique	France	Du 30 septembre au 06 octobre
Slim tounsi	CBS	Belgique	Du 30 septembre au 02 octobre
Ahmed rebai	Etranger	Espagne	Du 14 au 17 octobre
Souad rouis	Citrus	Liban	Du 28 octobre au 08 novembre
Fathi herteli	Citrus	Liban	Du 07 au 18 novembre
Faiçal boukhili	Citrus	Liban	Du 07 au 18 novembre
Souaad rouis	Citrus	Turquie	Du 18 au 29 novembre
Sonia khoufi	Biogasman	Espagne	Du 20 au 24 novembre
Ahmed rebai	Organisme étranger	France	Du 25 novembre au 06 décembre
Monsef msadak	PHC-Utique	France	Du 15 au 21 Décembre
Riadh ben salah	Tuniso / marocain	Maroc	Du 16 au 23 décembre
Noura takeri	Tuniso / marocain	Maroc	Du 17 au 21 décembre
Mariem ellouze	Tuniso / marocain	Maroc	Du 23 au 28 décembre
Aida hmida	LBMIE	Italie	Du 23 au 29 décembre

B/ Liste des Invités Etrangers en 2019 :

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Abdeslem asahour	Tuniso / marocain	Maroc	06 au 13 janvier
Housem abouelwafa	Tuniso / marocain	Maroc	04 février au 04 mars
Abdallah zin	Tuniso / marocain	Maroc	04 au 10 février
Faiçal azayez	Tuniso / marocain	Maroc	Du 18 au 24 mars
Abdesatar asahour	LBME	France	Du 05 au 08 septembre
Moez rhimi	LBME	France	Du 28 octobre au 08 novembre
Puppala vekat ramchander	Tuniso / indien	Inde	Du 02 au 08 Décembre
Françoise Dumas	PHC-UTIQUE	France	Du 14 au 17 Décembre
Clotillde Ferroud	PHC-UTIQUE	France	Du 14 au 17 Décembre

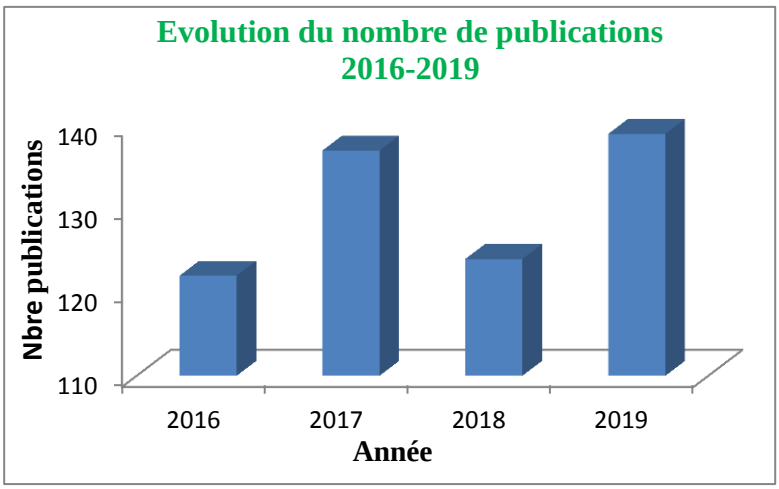
C/ Stages à l'Etranger en 2019:

Nom et Prénom	Nom du Labo/ Projet	Pays	Durée
Olfa frikha	LB	Inde	Du 03 au 17 février
Aicha boukhris	Tuniso / maroquin	Maroc	Du 01 février au 01 mars
Firas feki	Organisme étranger	Bulgarie	Du 01 février au 30 avril
Sondes mechri	LBMIE	France	Du 01 mars au 30 avril
Libna jlayel	Organisme étranger	France	Du 01 mars au 30 avril
Fathi aloui	Organisme étranger	France	Du 01 mars au 30 avril
Thaouia markbi	LBAP	Espagne	Du 01 avril au 31 mai
Hana triki	LPCMC	Belgique	Du 01 mai au 01 juillet
Ameni haj brahim	PHC-Utique	France	Du 12 mai au 01 aout
Sahar salemi	LBAP	France	Du 20 mai au 05 aout
Thaouiya markbi	LBAP	Espagne	Du 01 au 30 juin
Fatma ebdelmoula	PHC-Utique	France	Du 01 au 31 juillet
Aycha chouikhi	LMB	Maroc	Du 01 septembre au 01 novembre
Sonia mhiri	LBMIE	Italie	Du 01 septembre au 30 novembre
Fatma abdelmola	PHC-Utique	France	Du 07 septembre au 09 novembre
Esmahen akrmi	LBAP	Belgique	Du 09 septembre 2019 au 20 mars 2020
Firas feki	Organisme étranger	Espagne	Du 09 septembre au 08 décembre
Habib khouthi	LBAP	France	Du 15 au 30 septembre
Thouha maslbi	LPCMC	Allemagne	Du 20 septembre au 20 décembre
Sawsan herzeli	LBAP	Espagne	Du 01 octobre 2019 au 28 fevrier 2020
Amal souissi	Tuniso / allemand	Allemagne	Du 10 au 16 octobre
Sonia kachaw	LBAP	France	Du 14 au 28 octobre
Lotfi mallouli	LMB	France	Du 17 au 31 octobre

Fatma karray	Organisme étranger	Grèce	Du 01 novembre au 31 décembre
Ali gargouri	PHC-Utique	France	Du 01 au 15 novembre
Aycha chouikhi	Tuniso / maroquin	Maroc	Du 01 au 31 décembre
Kais jamoussi	LB	France	Du 02 au 16 décembre
Mohamed ali masmoudi	Organisme étranger	Grèce	Du 15 décembre 2019 au 14 janvier 2020
Slim loukil	Organisme étranger	Grèce	Du 15 décembre 2019 au 14 janvier 2020

11. Production Scientifique en cours de 2019:

	2019
Articles, Revues Internationales	**139**
Chapitres d'ouvrages scientifiques, actes de colloques internationaux	**7**
Brevets nationaux	**5**
Brevets internationaux	**-**
Doctorats et Habilitations Soutenus	**22**
Mastères	**14**
PFE	**9**



12.Séminaires, journées et ateliers scientifiques

1/ Organisation de workshop: Evaluation of algal treatment options for olive mill wastewater to produce energy and biofertilizer - **PEER Project (USAID)**. Hôtel Syphax, Sfax, 9-10/07/2019.

2/ Journées **LMI COSYS-Med**: Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranéens. Hammamet, 28-30/11/2019.

3/ Partipation à Tunisia-Japan Symposium on Science Society and Technology (**TJASSST 2019**). Sousse, 29/11 - 02/12/2019.

4/ Organisation des 18ème Journées Internationales de Biotechnologie **(IDB2019/JIB 2019)** de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (A.T.Biotech.) à Sousse-Tunisie du 20 au 23 décembre 2019.

5/ Organization of **Second Mediterranean Congress on Biotechnology (MCB2)** à l'hôtel Saphir Palace Hammamet, Tunisia. March 16th- 20th, 2019

6/ Organisation dans le cadre du **projet BIOSMAN de :** Table ronde «Laser speckle imaging: Principles & Applications» le 2 Juillet 2019 à Sfax (CBS), Tunisie

7/ Participation à 4th International conference of Engineering Sciences on Biology and Medicine **(ESBM2019)**, à la Faculté de Médecine de Sfax, Octobre 2019

8/ Participation à First **ISN/Bro** Tunisia based school of Neuroscience: from basic functions to neurodegeneratrive diseases. Faculté des Sciences de Sfax, Nov 24-dec 1, 2019

9/ Organisation en collaboration avec l'Amicale des Agents du CBS de la **1ère Journée Nationale de la Qualité dans l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique JNQESRS.** Hôtel Sangho Syphax à Sfax, le 28 Novembre 2019

13.Prix et Distinction

Obtention du 1er prix Borj el Kallel pour le meilleur projet de recherche en discipline 'Sciences et technologies', décerné à Slim Smaoui du LBMIE organisé en collaboration avec l'Université de Sfax dans le cadre de la 21 ème édition de **l'UNIVEXPO 2019.**

R15CBS01 : Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE)

مخبر الأساليب البيئية

Directeurs: Prof. Sami SAYADI (Janvier 2019)
Email : sami.sayadi@cbs.rnrt.tn

et Prof. Mohamed CHAMKHA (Depuis le 01/02/2019)
Email : mohamed.chamkha@cbs.rnrt.tn

COMPOSITION DU LABORATOIRE

Nom et Prénom	*Qualité*	*Nom et Prénom*	*Qualité*
Mohamed Chamkha	Professeur	Emna Sahli	Ingénieur contractuel
Sami Sayadi	Professeur (en détachement, à partir de Février 2019)	Manel Chelbi	Technicien contractuel
Wahiba Najjar	Professeur (ISEPBG-Soukra)	Fatma Ben Amor	Technicien contractuel
Sonia Khoufi	Maître de conférences	Faten Nasri	Assistante de gestion contractuelle
Ali Mekki	Maître de conférences (FS-Gafsa)	Omar Ouled El Farhani	Ouvrier contractuel
Fatma Karray	Maître assistant	Najwa Mlaik	Post-doc
Mariem Ellouze	Maître assistant	Amal Zayen	Post-doc
Zouhaier Bouallegui	Maître assistant	Ines Dahmen	Post-doc
Ines Feki	Maître assistant (ISB-Sfax)	Fatma Hadrich	Post-doc
Nozha Abid	Maître assistant (FS-Sfax)	Raida Karray	Post-doc
Ahlem Saddoud	Maître assistant (FS-Sfax)	Hanen Kharrat	Post-doc
Meryem Jemli	Maître assistant (FS-Tunis)	Ahlem Jebali	Post-doc
Hanen Chakroun	Maître assistant (ISB-Sidi Thabet)	Amina Maalej	Post-doc
Manel Hamza	Technologue (ISET-Sfax)	Asma Mahmoudi	Post-doc
Fathi Aloui	Ingénieur général	Dorra Hentati	Post-doc
Firas Feki	Ingénieur général	Mariem Samet	Post-doc
Mohamed Ali Masmoudi	Ingénieur en chef	Emna Feki	Doctorante
Najla Mhiri	Technicien principal	Mariem Jeddi	Doctorante
Slim Loukil	Technicien principal	Meriam Cheffi	Doctorante
Nidhal Baccar	Technicien principal	Raouia Boujelben	Doctorante
Sonia Kchaou	Technicien	Imen Siala	Doctorante
Salma Kchaou	Assistante de gestion	Imen Halouani	Doctorante
Sirine Choura	Ingénieur contractuel	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, déchets solides...), 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 2019 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: Biodégradation 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: Prof. Sami SAYADI)

- **Réponse des communautés bactériennes à un dépôt d'aérosols atmosphériques dans les eaux côtières de Sfax (Golfe de Gabès, Tunisie):**

Les particules (aérosols) atmosphériques constituent une source majeure de carbone organique, de nutriments et d'éléments traces métalliques (ETMs) pour l'océan. En raison de sa proximité des zones désertiques d'Afrique du Nord (apports de poussières sahariennes) mais aussi de la forte urbanisation de ses zones côtières (industries, trafic routier, agriculture intensive), la mer Méditerranée reçoit une quantité importante d'éléments chimiques par voie atmosphérique. Le dépôt annuel d'aérosols dans les eaux de surface méditerranéennes peut en effet dépasser 20 g m^{-2}. Aussi, de nombreuses études se sont intéressées ces dernières années à l'impact des aérosols atmosphériques sur les communautés planctoniques de Méditerranée. Cependant, la majorité de ces travaux se sont focalisés sur l'effet des poussières sahariennes, c'est à dire d'aérosols peu influencés par l'activité anthropique. Or il a été montré que les aérosols collectés dans les zones urbaines côtières étaient beaucoup plus riches en contaminants organiques (HAPs, PCBs, pesticides) et inorganiques (ETMs). Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'impact des aérosols urbains anthropisés sur le fonctionnement des écosystèmes marins méditerranéens. Les objectifs de ce travail sont d'étudier la composition chimique des aérosols de la ville industrielle de Sfax et d'évaluer la réponse du bactérioplancton aux apports de ces aérosols dans deux stations différentes nord et sud des eaux côtières de la ville de Sfax (Golfe de Gabès). Durant cette étude, les aérosols de Sfax ont été collectés par un échantillonneur à haut débit sur des filtres durant 2 jours. L'extrait aqueux d'aérosols, obtenu à partir de ces filtres, a été introduit dans des microcosmes contenant 1 à 5 litres d'eau de mer des deux stations étudiées (concentration finale en aérosols de 5 mg/l), et incubés en condition *in situ* durant 4 jours. L'analyse des ETMs faite par ICP-MS a démontré des concentrations élevées en Sr, Mn, Zn, Cu, V, et Pb dans les aérosols. L'ajout d'aérosols a engendré une augmentation de la turbidité dans les microcosmes des deux stations. Une diminution des matières en suspension a été observée à la fin des incubations. Un enrichissement en Mn, Ni, et Pb et Cu a été observé dans les incubations d'eau de mer de la station Nord et seulement en Zn dans celles de la station Sud. Des différences d'abondance bactérienne estimée par PCRq ont été observées entre les stations nord et sud. Cependant, l'ajout d'aérosols n'a pas eu d'effet significatif sur l'abondance bactérienne, suggérant une adaptation de la diversité microbienne aux ETMs ou des concentrations initiales en nutriments potentiellement élevées dans les eaux de mer étudiées. Les prochaines analyses de nutriments et de diversité bactérienne à partir des microcosmes permettront de valider ces dernières hypothèses.

- **Etude de l'importance de la co-culture « diatomée benthique-bactérie » dans la biodégradation des HAPs:**

La contamination des écosystèmes marins par les polluants chimiques, est un sujet d'actualité, à cause de ses impacts désastreux sur l'environnement qui contribuent à la fragilisation de ces écosystèmes suite à une pression par les activités anthropiques. Une grande partie de ces composés toxiques est adsorbée sur les particules en suspension, puis accumulée au niveau des sédiments. Ainsi, les dépôts sédimentaires deviennent de véritables réservoirs pour de nombreux contaminants. Les lagunes méditerranéennes ne sont pas épargnées de la pollution chimique. C'est le cas de la lagune de Bizerte qui se trouve sous une importante pression anthropique (industrielle, urbaine et agricole) condant à sa contamination par divers polluants, dont les HAPs. Des travaux récents ont montrées des teneurs assez élevées de HAPs dans les sédiments de la lagune. Depuis quelques années, plusieurs travaux se sont focalisés à mesurer le niveau de la contamination par les HAPs de la lagune et aussi évaluer leur impacts sur les microorganismes planctoniques. Cependant très peu d'études ont porté sur la décontamination de cet écosystème par les microoganismes indigènes. Une thèse réalisée dans le cadre du LMI «CosysMed» a révélé que des cultures de deux nouvelles diatomées dans la lagune (*Pseudo-nitzschia mannii* et *P. hasleana*) étaient capables d'accumuler et de dégrader un cocktail de 15 molécules de HAPs. Les résultats de ces différents travaux ont mis en exergue que les microorganismes indigènes de la lagune (bactéries ou diatomées) ont des potentiels dans la biodécontamination de cet écosystème. Par conséquent, il était fort intéressant d'évaluer leur pouvoir synergétique ou co-métabolique dans ce processus pour une application plus efficace, plus rapide et plus valorisante dans la bioremédiation. Le but principal de ce travail était d'étudier l'importance de la co-culture «diatomée benthique-bactérie» dans la biodégradation des HAPs. Au cours de cette étude, la caractérisation microbienne (procaryotique et eucaryotique) d'un échantillon de sédiments prélevé de la lagune de Bizerte et l'isolement d'une diatomée benthique de cet échantillon ont été réalisées. Dans un premier temps, l'étude de la diversité et l'abondance des bactéries libres (FB) et épiphytiques (AB), présentes dans les cultures de la diatomée, en ciblant le gène de l'ARN ribosomal 16S moyennent le séquençage à haut débit Miseq illumina et la PCR quantitative en temps réel, a été réalisée. Les résultats ont montré une diversité importante de bactéries appartenant au phylum *Proteobacteria* et des phytoplanctons avec une présence majeure des dinoflagellés (**Fig. 1**).

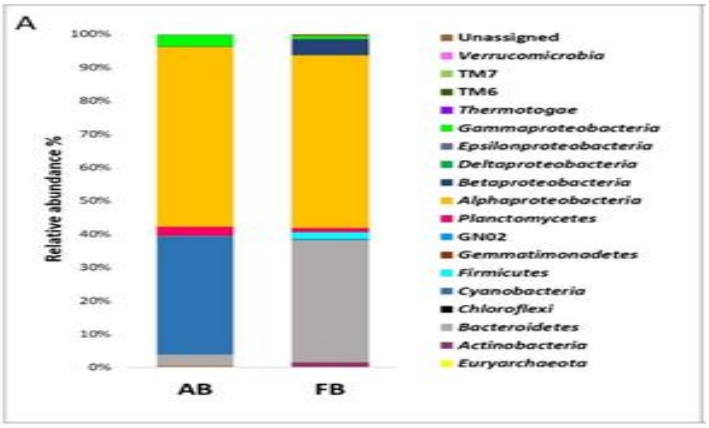


Fig. 1. Composition de la communauté procaryotique dans la culture diatomée.

Au biais du microscope électronique en transmission, une diatomée a été identifiée comme étant *Nitzschia bizertensis*, l'identification taxonomique à l'aide des outils moléculaire sont en cours pour déterminer le groupe phylogénétique et taxonomique de cette espèce. Différentes souches de bactéries libres et une souche épiphytique, présentes dans les cultures de *Nitzschia bizertensis*, ont pu être isolées et identifiées. Le test de dégradation du pétrole brut a révélé que trois souches, parmi les six isolées, ont présenté un pouvoir de dégradation de ce contaminant. L'évaluation de l'impact de la coprésence de la diatomée avec les bactéries sur la biodégradation a été étudiée par la réalisation de différentes expérimentations de contamination par les HAPs sous différentes conditions (axénique/non axénique, lumière/obscurité).

Les résultats obtenus ont révélé que la contamination par deux HAPs n'a induit aucun effet significatif ni sur la croissance ni sur les abondances de la diatomée. De même, les bactéries ont maintenu une croissance similaire dans tous les traitements jusqu'à la fin des incubations dans les différentes contaminations. Ces résultats indiquent que la microalgue *Nitzschia bizertensis* ainsi que les bactéries, ont des capacités physiologiques qui leur permettent de tolérer les concentrations élevées des deux HAPs. La biodégradation a

contribué significativement à l'élimination des HAPs qui était meilleure lorsque la diatomée et les bactéries étaient en co-culture. Ceci prouve donc le pouvoir synergique des phototrophes et des bactéries dans l'élimination des HAPs.

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

- **Etude de la biodiversité microbienne des échantillons marins en utilisant la technique de séquençage haut-débit (Illumina MiSeq):**

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. L'approche métagénomique (Illumina MiSeq), a été utilisée pour étudier la composition de la biodiversité des procaryotes (*Bacteria* et *Archaea*) au niveau de six échantillons des eaux de mer, provenant de trois ports de la ville de Sfax. La méta-analyse des différents échantillons des eaux de mer, montre la présence du domaine *Bacteria*. Les archées n'ont pas été détectées dans ces échantillons. En milieu marin, les archées sont présentes essentiellement dans les sédiments anaérobies peu profonds ou profonds, dans les sources hydrothermales et dans les environnements fortement salins. Toutefois, plusieurs études ont montré la présence d'archées dans les eaux de surface oxygénées et ont montré leur rôle important dans le cycle biogéochimique. L'abondance relative des différents phyla/classes bactériens identifiés dans les échantillons des eaux de mer, est représentée dans la **figure 2**. Uniquement les phyla/classes présents avec des pourcentages supérieurs à 1% des séquences, ont été pris en considération. Les résultats montrent la dominance du phylum *Proteobacteria* (en particulier les classes des *Gammaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria*), suivi de *Bacteriodetes*, dans tous les échantillons des eaux de mer analysés. D'autres phyla (*Cyanobacteria*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, et autres) ont été également détectés avec des proportions relativement variables dans les différents échantillons des eaux de mer (**Fig. 2**). La présence des taxons indicateurs de la contamination par des hydrocarbures a été révélée dans les différents échantillons analysés. En effet, la dominance des *Proteobacteria*, un phylum qui englobe un grand nombre des taxons doués des capacités biodégradatives des hydrocarbures, a été notée. La majorité des bactéries hydrocarbonoclastes décrites actuellement appartiennent aux *Proteobacteria*, et en particlulier à la classe des *Gammaproteobacteria*. Par ailleurs, les phyla *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* renferment, également, un grand nombre de souches dégradant les hydrocarbures.

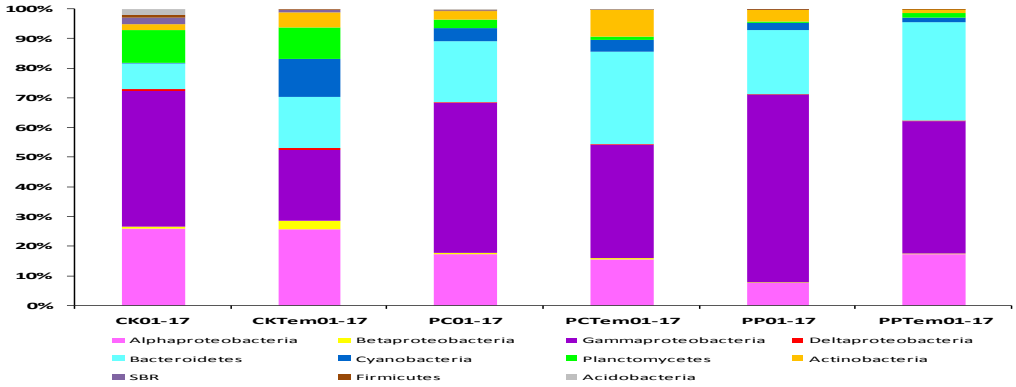


Fig. 2. Abondance relative des différents phyla/classes présents, dans les échantillons des eaux de mer, avec un pourcentage supérieur à 1% des séquences.

- **Biosurfactants d'une nouvellesouche marine hydrocarbonoclaste CO100:**

La souche CO100 est une bactérie marine hydrocarbonoclaste qui a été identifiée comme membre du genre *Staphylococcus*. Elle 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, ainsi que sur d'autres hydrocarbures (phénanthrène, fluoranthène, pyrène, mazout…).

Par ailleurs, CO100 a montré une grande capacité à synthétiser des agents tensioactifs sur différentes sources de carbone. La caractérisation de ces biosurfactants montrent qu'ils sont doués des propriétés tensiactives puissantes: une faible CMC, une réduction importante de la tension de surface, une formation des halos de diamètres importants lors des tests de déplacement d'huile, une grande stabilité *vis-à-vis* d'une large gamme de pH (4,3 à 12), de température (-20 à 121°C) et de salinité (0 à 300 g/l NaCl). Les biosurfactants bruts produits par la souche CO100 ont été purifiés. Deux fractions ayant une réaction positive avec le ninhydrine et l'acide phosphomolibdique et montrant une diminution de la tension de surface à 28 mN/m ont été analysées par la spectrométrie de masse ESI/MS (**Fig. 3**). En comparant ces masses avec des masses mentionnées dans la littérature, ces pics pourraientt être attribués à des lipopeptides et en particulier à des lichenysines et des iturines, dans la 1ère fraction et des bacillomycines dans la 2ème fraction.

Afin d'évaluer la cytotoxicité des biosurfactants bruts produits par la souche CO100, la viabilité des cellules rénales humaines HEK (Human Embryon Kidney 293) a été déterminée après traitement des cellules avec différentes concentrations (0-1000 µg/ml), durant 24 h et 48 h.

Les résultats montrent que pour toutes les concentrations testées de BS-CO100, le taux de viabilité des cellules HEK traitées est supérieur à 80%. Les effets des biosurfactants produits par la souche CO100 sur la solubilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée, en les comparant avec des surfactants chimiques (Tween 20, Tween 80, Triton x-100 et SDS), ont été réalisés. Les résultats montrent un effet de remobilisation plus important par rapport à celui des tensioactifs chimiques. En plus, l'effet cicatrisant de BS-CO100 a été évalué *in vivo*, sur des rats de race Wistar ayant subi une plaie mécanique (une excision cutanée dorsale de 1,5 cm × 1 cm). Les résultats montrent que les quatre biotensioactifs possèdent une dynamique de cicatrisation plus efficace que celle du produit de référence CICAFLORA®.

En outre, l'application des biosurfactants BS-CO100 dans la prévention (pré-traitement) et l'élimination (post-traitement), des biofilms microbiens qui sont considérés comme une source de problèmes tant dans le domaine médical que dans l'industrie ou même l'environnement, a été réalisée.

Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants testés ont des activités anti-biofilm et anti-adhésive importantes contre la formation des biofilms d'une variété des microorganismes testés: bactéries à Gram négatif, bactéries à Gram positif, ainsi que la levure *Candida albicans*.

Au vu de ces résultats la souche CO100, ainsi que ses biosurfactants demeurent prometteurs et pourraient être utilisés avec succès dans divers applications biotechnologiques. Ils peuvent servir pour performer les stratégies de bioremédiation des eaux et des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures, ainsi que d'autres applications (industrie, cosmétique…).

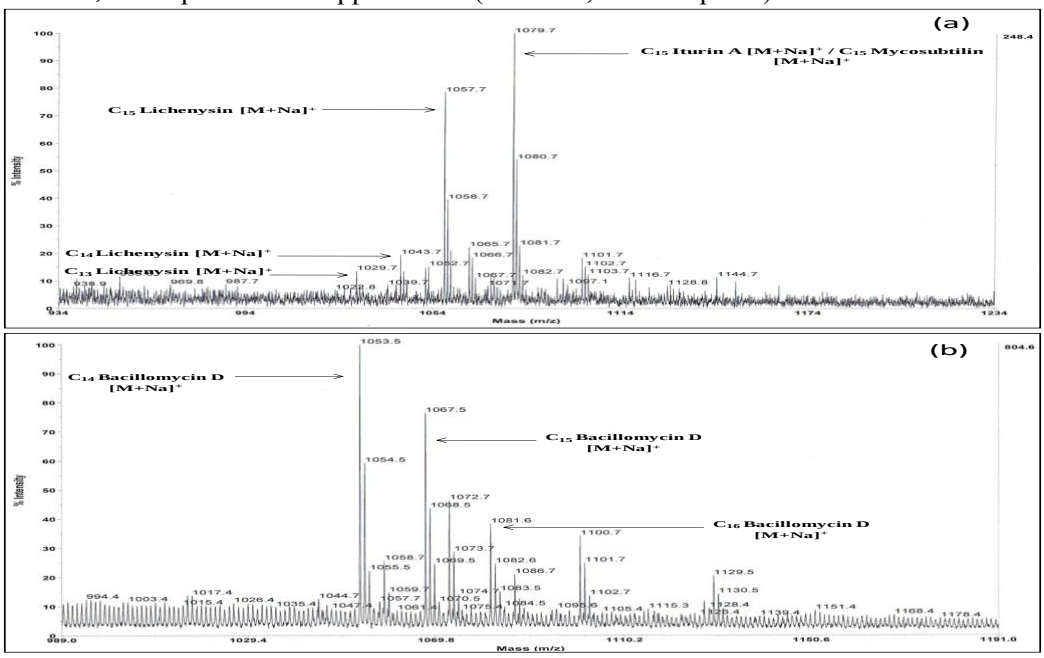


Fig. 3. Spectres de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche CO100.
(a) et (b): deux sous-fractions ayant des polarités différentes, choisies après analyse par CCM.

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

La capacité d'une souche microalgale à éliminer les principaux polluants des margines a été évaluée. Des cultures microalgales ont été réalisées en utilisant comme source de nutriments différents types de margines prétraitées, par ultrafiltration (UF), par électrocoagulation (EC) et par adsorption sur charbon actif en utilisant deux conditions de traitement différentes (CA1 et CA2). Chaque milieu a été utilisé à différentes concentrations 10, 25, 50 et 100%.

Les résultats ont démontré que la souche était capable de s'adapter à des concentrations élevées en milieu EC, CA1 et CA2 alors qu'elle était sous stress lors de l'utilisation de 100% de UF. Une diminution de la concentration en TOC de 94%, 79%, 64% et 63% a été déterminée lors de l'utilisation de CA1 à 25%, CA2 à 25%, CA1 à 100% et UF à 25%, respectivement, alors que pour EC à 25% et CA1 à 50%, 58 % et 54% d'élimination du TOC ont été enregistrés. Concernant l'élimination des polyphénols, celle-ci variait de 47% à 73% lors de l'utilisation de UF. Elle variait de 100% à 40% pour EC. Quant au CA1, les polyphénols ont été totalement éliminés pour toutes les concentrations testées, mais pour CA2 cela n'a été observé que pour CA2 à 25%.

La souche a été cultivée dans un réacteur colonne à bulles en utilisant deux milieux de culture, EC 50% et CA1 100% (**Fig. 4**).

Fig. 4. Photo-bioréacteurs colonnes à bulle utilisés pour la culture en batch de la microalgue. Les margines prétraitées EC à 50% et CA 1 à 100% sont utilisés comme milieu de culture.

Les polluants ont été éliminés à des pourcentages de 66,80% et 46% pour TOC et 61,50% et 100% pour les polyphénols, en utilisant EC à 50% et CA1 à 100%, respectivement. La biomasse produite à partir du milieu EC 50% a montré une teneur élevée en protéines de 46,90% tandis que 56,80% des glucides ont été déterminés lors de l'utilisation de CA1 100%.

De plus, d'autres souches microalgales ont été cultivées sur margines prétraitées par digestion anaérobie. La biomasse obtenue a été récupérée par microfiltration et lyophilisée. Afin d'évaluer le potentiel des microalgues étudiées en termes de production des molécules actives, les techniques d'extraction par solvant sous pression (PSE) et par ultrasonication ont été réalisées selon un gradient de solvant. Les extraits récupérés ont été concentrés par rota-évaporation. Le rendement d'extraction variait de 85,47% et 21,46 %, respectivement. Ensuite, le fractionnement des extraits par chromatographie de partage centrifuge a été effectué. Des analyses par UPLC-MS-MS ont révélé la présence des pigments à savoir: *alpha*-carotène, Antheraxanthine, Astaxanthine, *Beta*-carotène, Canthaxanthine, Chlorophylle a et b, Echinenone, Loroxanthine, Lutéine, Phéophytine et Neoxanthine.

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

De nos jours, la digestion anaérobie est largement appliquée pour les déchets ménagers soit en substrat unique ou en co-digestion. L'objectif du travail réalisé est d'améliorer le potentiel méthane de la fraction fermentescible de déchets ménagers (FFDM) par l'application de la technologie de co-digestion avec d'autres déchets organiques et l'évaluation de leur fermentation sèche dans un réacteur hybride discontinu à percolation. Nous avons commencé ce travail par la caractérisation physico-chimique de trois substrats : FFDM, déchets de restaurant (DR) et fiente de volaille (FV). Les résultats obtenus ont montré que FFDM et DR sont potentiellement riches en carbone avec un rapport C/N élevé de 26,50 et

84,56, respectivement. Un rapport faible C/N = 9,23 a été déterminé pour la FV montrant ainsi sa richesse en azote organique.

Des essais de fermentation anaérobie en batch ont été réalisés avec différentes combinaisons déterminées selon le plan de mélange (mixture design) (**Fig. 5**). Les résultats ont montré que la production de méthane a été améliorée par l'ajout de la FV aux deux substrats. Des faibles rendements de 66,58 et 200,68 ml/g MV ont été enregistrés lors de la mono-fermentation de FFDM et de DR, respectivement. Cependant, la co-digestion de ces deux substrats avec la FV a amélioré leur rendement en méthane. Un rendement important en méthane cumulé de 505,68 ml/g MV a été obtenu par le mélange 1/2 (DR+FV). Ce batch a montré un pH au alentour de la neutralité (pH = 7,8) et a présenté une teneur en TAC <5 g/l qui est inférieure à la limite de l'inhibition des populations microbiennes. Néanmoins, une autre meilleure fermentation en terme de vitesse de production et en terme de rendement a été observée par le batch 2/3 FFDM+1/6 (FV+DR). Les résultats ont montré aussi l'accélération de la production de méthane avec amélioration des rendements. De ce fait, ces constations sont en faveur d'appliquer la co-digestion pour les substrats difficilement méthanisables comme la FFDM.

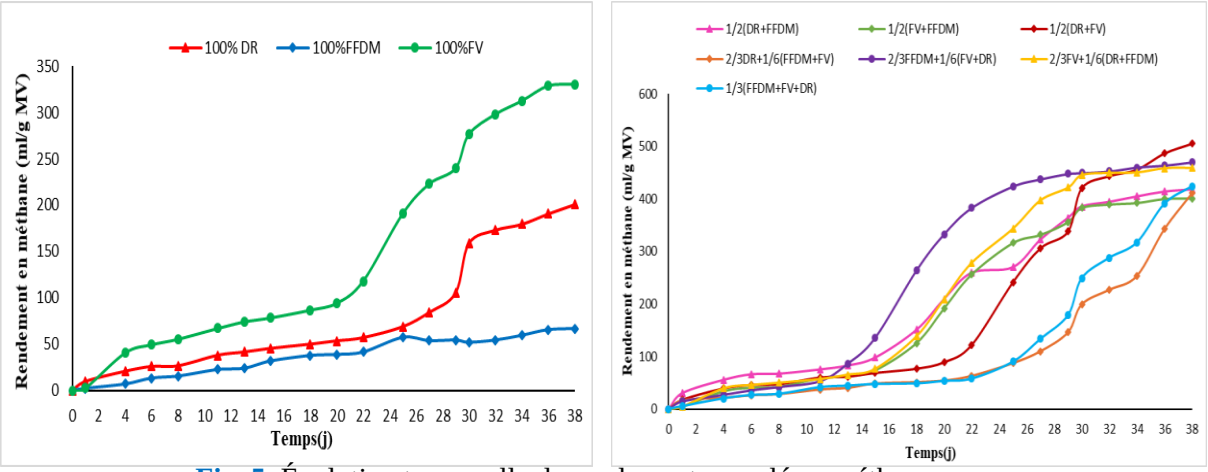


Fig. 5. Évolution temporelle du rendement cumulé en méthane au cours de la mono-fermentation et de la co-digestion des substrats.

Par ailleurs, l'étude de la digestion anaérobie en batch dans un réacteur hybride à percolation a été appliquée selon les proportions optimales obtenues par le plan d'expérience. Les analyses de suivi de la fermentation en batch ont montré que les mono-fermentations avec la FFDM brute ont abouti à des faibles rendements en méthane entre 0,11 et 0,3 l/g MV, même avec l'application des prétraitements mécaniques. Cependant, les co-digestions de la FFDM et le DR avec la FV ont montré une amélioration de la production de biogaz avec des rendements cumulés variant de 0,5 à 0,63 l/g MV (**Fig. 6**). Ainsi, il a été noté que l'ajout de la FV comme co-substrat riche en azote stabilise le système anaérobie avec augmentation du rendement en méthane de FFDM et DR. Ceci peut être expliqué aussi par le fait que la FV a un pouvoir tampon très important.

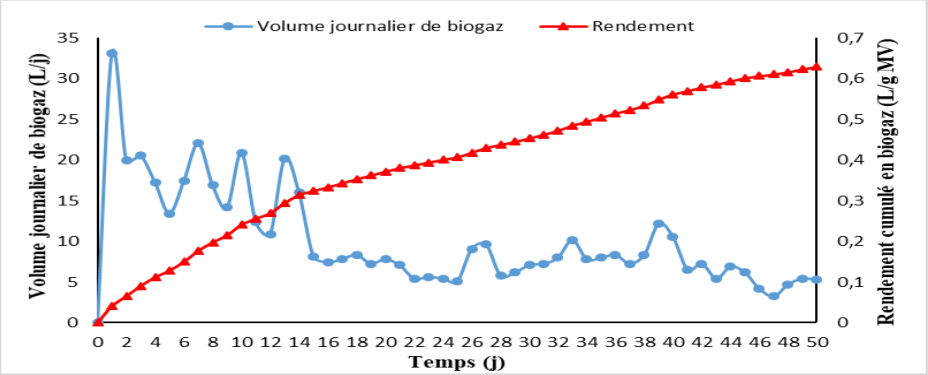


Fig. 6. Evolution journalière du volume et du rendement cumulé en biogaz au cours de la co-digestion de FFDM et FV en réacteur hybride discontinu.

Les digestâts anaérobies, sous-produits de la méthanisation, sont reconnus comme des biofertilisants pour leurs avantages en termes de récupération des éléments nutritifs et de recyclage de différents types de déchets organiques. Dans le but d'évaluer le caractère fertilisant des digestâts liquides récupérés du réacteur hybride, une caractérisation physico-chimique a été effectuée. La phytotoxicité des digestâts a été aussi évaluée par la détermination de l'indice de germination de graines de Cresson. Les résultats ont montré que les digestâts issus des mono-fermentations sont phytotoxiques vu leur caractère acide et la forte concentration en AGV (12,5 g/l). Des pH basiques et des faibles concentrations en AGV ont été déterminés pour les digestâts issus des co-fermentations. Les résultats des tests de phytotoxicité appliqués sur ces digestâts ont montré des indices de germination supérieurs à 50% montrant ainsi le caractère non phytotoxique. Ce critère avec la richesse en azote ammoniacal de 1 g/l mettent en évidence la valeur fertilisante des digestâts issus de la co-digestion de FFDM, le DR et la FV.

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

Dans une première partie de ce travail, des conditions d'extraction ont été optimisées pour obtenir des extraits microalgales ayant un potentiel antioxydant maximal. Afin d'évaluer la capacité des extraits de microalgues à piéger les radicaux libres *in-vitro*, nous avons sélectionné l'activité des radicaux libres du dosage DPPH. Nos résultats ont montré que l'extrait de (Sc-UF) présentait une capacité de piégeage de DPPH plus élevée que celle de (Sc) avec une concentration inhibitrice maximale (IC50) de 0,159 µg/ml. Les composés phénoliques solubles totaux dans les différents extraits ont été analysés quantitativement avec le réactif de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme standard. La teneur totale en polyphénols atteignait 19,38 et 64,06 mg d'équivalent d'acide gallique/g de poids d'extrait Sc et Sc-UF, respectivement. L'analyse qualitative par HPLC des deux extraits a montré que les composés phénoliques étaient plus abondants dans l'extrait Sc que dans l'extrait Sc-UF.

Le deuxième volet de ce travail a été consacré à l'évaluation de la cytotoxicité et les effets antiprolifératifs. Des cellules HEK-293 saines dérivées de cellules rénales embryonnaires humaines ont été utilisées. Pour les lignées cellulaires cancéreuses, des cellules de mélanome B16 de souris produisant des pigments de mélanine ont été utilisées.

Pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, un test MTT a été effectué. Des cellules en croissance exponentielle ont été ensemencées sur des plaques à 96 puits et incubées pendant 24 h à 37 °C dans un incubateur à 5,0% de CO_2. Les extraits ont été ensuite appliqués à des concentrations allant de 7,8 à 250 µg/ ml pendant 48 h (**Fig. 7**).

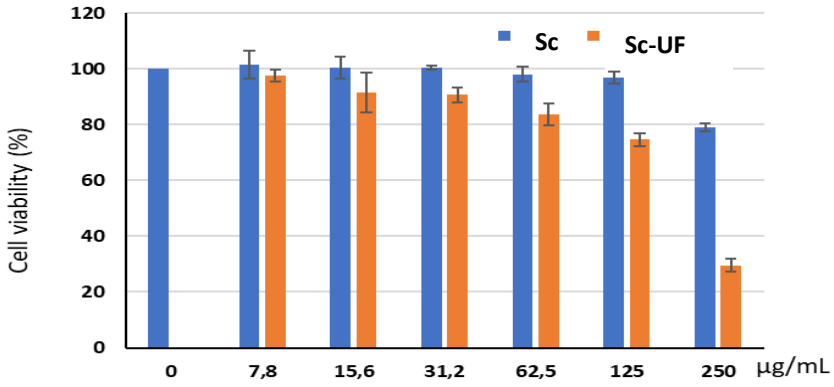


Fig. 7. Cytotoxicité des cellules saines HEK-293.

L'extrait Sc s'est révélé être plus efficace pour supprimer la viabilité de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines montrant une certaine sélectivité qui est probablement causée par leurs riches quantités en composés phénoliques. En effet, à la même concentration, le niveau de cytotoxicité de l'extrait Sc atteint 18,01% contre 38,73% pour l'extrait Sc-UF. De même, à une concentration de 125 µg/ml, bien que l'extrait Sc n'ait pas montré d'effet toxique contre les cellules PC12 à toutes les concentrations testées, l'extrait Sc-UF a atteint environ 24,34% de cytotoxicité à une concentration de 125 µg/ml (**Fig. 8**).

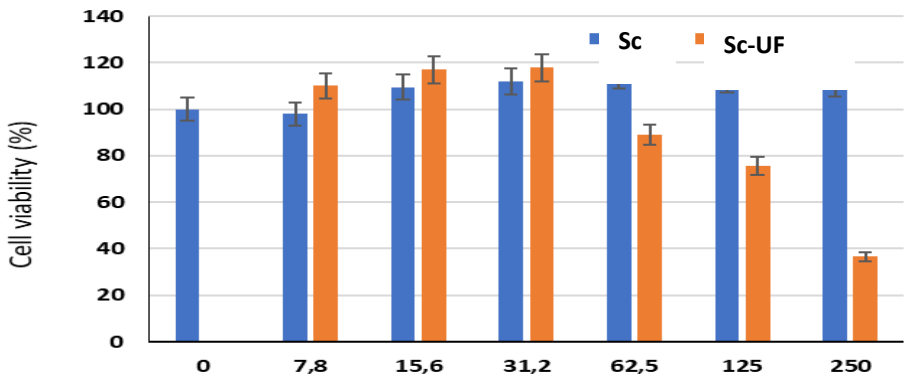


Fig. 8. Viabilité cellulaire des cellules PC12.

Sur la base d'essais sur les cellules de mélanome B16, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits sur la mélanogenèse. Ainsi, la teneur intracellulaire en mélanine, qui reflète directement l'activité anti-mélanogénique, a été évaluée en utilisant comme témoin positif l'acide kojique, l'un des inhibiteurs les plus utilisés de la formation de pigments dans les produits cosmétiques utilisés pour l'éclaircissement de la peau. Nos résultats ont montré que la teneur relative en mélanine diminuait avec l'augmentation des concentrations des deux extraits. De plus, à une concentration de 125 µg/mL, l'extrait de Sc-UF a présenté l'activité anti-mélanogénique la plus élevée.

Étant donné que l'évaluation de l'activité tyrosinase intracellulaire est constamment la première étape dans l'étude de la synthèse de mélanine. L'effet inhibiteur des deux extraits a été évalué sur l'activité de la tyrosinase cellulaire. Dans ce but, des cellules de mélanome humain B16 ont été cultivées en présence d'extrait de Sc ou SC-UF pendant 2 jours. Le lysat cellulaire a été incubé avec du L-DOPA à 37 °C pendant 1 h. Les résultats ont montré que l'activité inhibitrice de la tyrosinase augmentait avec l'augmentation des concentrations des deux extraits, en particulier pour l'extrait de Sc-UF.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

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

1. Ben Abdallah, M., Karray, F. & Sayadi, S. **2019**. Production of polyhydroxyalkanoates by two halophilic archaeal isolates from Chott El Jerid using inexpensive carbon sources. *Biomolecules*, **10** (1). 10.3390/biom10010109.

2. Ben Ouada, S., Ben Ali, R., Cimetiere, N., Leboulanger, C., Ben Ouada, H. & Sayadi, S. **2019**. Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis* sp. and *Graesiella* sp. *Ecotoxicol Environ Saf*, **186**. 109769. 10.1016/j.ecoenv.2019.109769.

3. Ben Younes, S., Ben Khedher, S., Zhang, Y., Geissen, S.-U. & Sayadi, S. **2019**. Laccase from *Scytalidium thermophilum*: Production improvement, catalytic behavior and detoxifying ability of diclofenac. *Catalysis Letters*, **149** (7), 1833-1844. 10.1007/s10562-019-02771-1.

4. Bouallagui, Z., Mahmoudi, A., Maalej, A., Hadrich, F., Isoda, H. & Sayadi, S. **2019**. Contribution of major polyphenols to the antioxidant profile and cytotoxic activity of olive leaves. *Anticancer Agents Med Chem*, **19** (13), 1651-1657. 10.2174/1871520619666190416101622.

5. Boujelben, R., Ellouze, M. & Sayadi, S. **2019**. Detoxification assays of Tunisian tannery wastewater under nonsterile conditions using the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Biomed Res Int*. 9020178. 10.1155/2019/9020178.

6. Cheffi, M., Hentati, D., Chebbi, A., Mhiri, N., Sayadi, S., Marques, A.M. & Chamkha, M. **2019**. Isolation and characterization of a newly naphthalene-degrading *Halomonas pacifica*, strain Cnaph3: biodegradation and biosurfactant production studies. *3 Biotech*, **10** (3). 89. 10.1007/s13205-020-2085-x.

7. Chifflet, S., Tedetti, M., Zouch, H., Fourati, R., Zaghden, H., Elleuch, B., Quéméneur, M., Karray, F. & Sayadi, S. **2019**. Dynamics of trace metals in a shallow coastal ecosystem: insights from the Gulf of Gabès (southern Mediterranean Sea). *AIMS Environmental Science*, **6** (4). 277-297. 10.3934/environsci.2019.4.277.

8. Feki, E., Battimelli, A., Sayadi, S., Dhouib, A., Khoufi, S. **2019**. High-rate anaerobic digestion of waste activated sludge by integration of Electro-Fenton process. *Molecules*, **25** (3). 10.3390/molecules25030626.

9. Fki, I., Sayadi, S., Mahmoudi, A., Daoued, I., Marrekchi, R. & Ghorbel, H. **2019**. Comparative study on beneficial effects of hydroxytyrosol- and oleuropein-rich olive leaf extracts on high-fat diet-induced lipid metabolism disturbance and liver injury in rats. *Biomed Res Int*. 1315202. 10.1155/2020/1315202.

10. Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A. & Chamkha, M. **2019.** Production and characterization of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **167:** 441-449. DOI: 10.1016/ j.ecoenv.2018.10.036.

11. Jebali, A., Acien, F.G., Jimenez-Ruiz, N., Gomez, C., Fernandez-Sevilla, J.M., Mhiri, N., Karray, F., Sayadi, S. & Molina-Grima, E. **2019**. Evaluation of native microalgae from Tunisia using the pulse-amplitude-modulation measurement of chlorophyll fluorescence and a performance study in semi-continuous mode for biofuel production. *Biotechnol Biofuels*, **12**. 119. 10.1186/s13068-019-1461-4.

12. Jemai, H., Feryani, A., Mahmoudi, A., Fki, I., Bouallagui, Z. & Sayadi, S. **2019**. Oleuropein protects kidney against oxidative and histopathological damages in subchronic cadimium intoxicated mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, **57** (8), 602-609.

13. Ktata, A., Krayem, N., Aloulou, A., Bezzine, S., Sayari, A., Chamkha, M. & Karray, A. **2019.** Purification, biochemical and molecular study of lipase producing from a newly thermoalkaliphilic *Aeribacillus pallidus* for oily wastewater treatment. *J. Biochem.* 10.1093/jb/mvz083.

14. Kehili, M., Sayadi, S., Frikha, F., Zammel, A. & Allouche, N. **2019**. Optimization of lycopene extraction from tomato peels industrial by-product using maceration in refined olive oil. *Food and Bioproducts Processing*, **117**, 321-328. 10.1016/j.fbp.2019.08.004.

15. Mechri, S., Sellem, I., Bouacem, K., Jabeur, F., Chamkha, M., Hacene, H., Bouanane-Darenfed, A. & Jaouadi, B. **2019**. Antioxidant and enzyme inhibitory activities of metapenaeusmonoceros by-product hydrolysates elaborated by purified alkaline proteases. *Waste and Biomass Valorization*. 10.1007/s12649-020-00942-5.

16. Mekki, A., Aloui, F. & Sayadi, S. **2019**. Influence of biowaste compost amendment on soil organic carbon storage under arid climate. *J Air Waste Manag Assoc*, **69** (7), 867-877. 10.1080/10962247.2017.1374311.

17. Messaoudi, D., Bouallagui, Z., Henab, A. & Moulti-Mati, F. **2019**. Protective effect of olive mill wastewater against lipid metabolism perturbation induced in cafeteria diet fed rats. **5** (2). http://www.aljest.org/index.php/aljest/article/view/26/26.

18. Mlaik, N., Khoufi, S., Hamza, M., Masmoudi, M.A. & Sayadi, S. **2019**. Enzymatic pre-hydrolysis of organic fraction of municipal solid waste to enhance anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, **127**. 105286. 10.1016/j.biombioe.2019.105286.

19. Mlaik, N., Sayadi, S., Hamza, M. & Khoufi, S. **2019**. Production and characterization of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* fermentation: Application for organic fraction of municipal solid waste hydrolysis and methane enhancement. *Biotechnol Prog*, **36** (1). e2902. 10.1002/btpr.2902.

20. Omrane Benmrad, M., Mechri, S., Zarai Jaouadi, N., Ben Elhoul, M., Rekik, H., Sayadi, S., Bejar, S., Kechaou, N. & Jaouadi, B. **2019**. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. *BMC Biotechnol*, **19**(1), 43. 10.1186/s12896-019-0536-4.

21. Rmili, F., Achouri, N., Smichi, N., Krayem, N., Bayoudh, A., Gargouri, Y., Chamkha, M. & Fendri, A. **2019**. Purification and biochemical characterization of an organic solvent-tolerant and detergent-stable lipase from *Staphylococcus capitis*. *Biotechnol Prog*, **35** (4). e2833. 10.1002/btpr.2833.

22. Samet, M., Karray, F., Mhiri, N., Kamoun, L., Sayadi, S. & Gargouri-Bouzid, R. **2019**. Effect of phosphogypsum addition in the composting process on the physico-chemical proprieties and the microbial diversity of the resulting compost tea. *Environ Sci Pollut Res Int*, **26** (21), 21404-21415. 10.1007/s11356-019-05327-3.

23. Smaoui, Y., Bouzid, J. & Sayadi, S. **2019**. Combination of air stripping and biological processes for landfill leachate treatment. *Environmental Engineering Research*, **25** (1), 80-87. 10.4491/eer.2018.268.

24. Smaoui, Y., Fersi, M., Mechichi, T., Sayadi, S. & Bouzid, J. **2019**. A new approach for detoxification of landfill leachate using *Trametes trogii*. *Environmental Engineering Research*, **24** (1), 144-149. 10.4491/eer.2018.014.

25. Smaoui, Y., Mseddi, S., Ayadi, N., Sayadi, S. & Bouzid, J. **2019**. Evaluation of influence of coagulation/flocculation and fenton oxidation with iron on landfill leachate treatment. *Environment Protection Engineering* **45** (1), 139-153. 10.5277/epe190111.

26. Touati, A., Jlaiel, L., Najjar, W. & Sayadi, S. **2019**. Photocatalytic degradation of sulfur black dye over Ce-TiO2 under UV irradiation: removal efficiency and identification of degraded species. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, **4** (1). 10.1007/s41207-018-0086-5.

- Brevets d'invention nationaux:

1- Inventeurs: Meriam Cheffi, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. (**2019**).
Titre : Production des biosurfactants par une nouvelle bactérie de *Halomonas venusta*: Caractérisation et applications biotechnologiques.
Référence : ***INNORPI N° TN2019/0269*** en date du 24 Septembre 2019.

2- Inventeurs: Manel Boudabbous, Mariam Zaidi, Meriam Cheffi & Ali Gargouri. (2019).
Titre : Biosynthèse de bio-tensioactifs par une ß-glucosidase fongique.
Référence : ***INNORPI N° TN2019/0270*** en date du 24 Septembre 2019

FORMATION DIPLOMANTE

- Habilitation Universitaire soutenue:

1- **Meryem Jemli:** Vers un environnement durable en Tunisie: Développement des procédés de dépollution et sensibilisations aux risques environnementaux. Habilitation Universitaire en Géologie, Option: Sciences de l'environnement. Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage. Soutenue le 29/07/2019.

- Thèses de doctorat es-sciences soutenues:

1- **Maha Affes Sahnoun:** Traitement des rejets avicoles par biométhanisation: mise en œuvre, optimisation et valorisation. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenue le 21/01/2019.

2- **Mariem Jeddi:** Valorisation biotechnologique des rejets salins et des sédiments marins: vers le développement d'approches intégrées couplant la production de bioénergie et le recyclage des ressources. Thèse de doctorat en Génie Biologique, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT), Tunis. Soutenue le 24/12/2019.

- Mastères soutenus:

1- **Maryem Slim:** Evaluation de l'effet de l'ajout de biochar issu de la pyrolyse des sous-produits de l'olivier sur le procédé de méthanisation des margines. Mastère de recherche, Biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenu le 28/12/2019.

2- **Jihen Abed:** Effet des cultures mixtes sur la fertilité du sol et analyse du profil microbien rhizosphérique et racinaire. Mastère de recherche, Biotechnologie microbienne, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenu le 03/01/2020.

3- **Ikbel Sadraoui:** Etude de la méthanisation de la fraction fermentescible des déchets ménagers en réacteur hybride discontinu. Mastère professionnel, Sciences et Technologies de l'Environnement, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax. Soutenu le 18/12/2019.

- Projets de Fin d'Etudes soutenus:

1- **Mayssa Louati:** Caractérisation et évaluation du potentiel biogaz des déchets organiques solides disponibles dans l'archipel de KerKennah. PFE Ingénieur en Génie des Systèmes Horticoles, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Meriem. Soutenu le 22/10/2019.

2- **Fatma Jerbi:** Amélioration de la méthanisation de la fraction fermentescible des ordures ménagères par intégration d'un prétraitement aérobie. PFE Ingénieur en Génie des Systèmes Horticoles, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Meriem. Soutenu le 22/10/2019.
3- **Marwa Megdiche:** Valorisation des margines séchées par pyrolyse : production de biochar et évaluation de sa capacité d'adsorption des polyphénols des margines. PFE Ingénieur en Génie Biologique, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax. Soutenu le 20/12/2019.
4- **Amira Rekik** et **Ameni Touhami:** Biodégradation des hydrocarbures et production des biosurfactants par deux souches bactériennes nouvellement isolées. Licence appliquée, Sciences de la vie et de l'environnement, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax. PFE soutenu le 19/06/2019.
5- **Imen Shili** et **Oussema Chebbi:** Etude et optimisation de procédé de traitement des margines par adsorption sur biochar. PFE Licence en Génie des Procédés, ISET, Sfax. Soutenu le 18/06/2019.
6- **Rihab Fraj:** Etude de l'adsorption des métaux à partir des effluents de tanneries. PFE Licence en Génie des Procédés, ISET, Sfax. Soutenu le 19/12/2019.

SEMINAIRES, JOURNEES ET ATELIERS SCIENTIFIQUES

1- Organisation de workshop: Evaluation of algal treatment options for olive mill wastewater to produce energy and biofertilizer - PEER Project (USAID). Hôtel Syphax, Sfax, 9-10/07/2019.
2- Journées LMI COSYS-Med: Contaminants et Ecosystèmes Marins Sud Méditerranéens. Hammamet, 28-30/11/2019.
3- Tunisia-Japan Symposium on Science Society and Technology (TJASSST 2019). Sousse, 29/11 - 02/12/2019.

CONVENTIONS AVEC DES PARTENAIRES SOCIO-ECONOMIQUES

1- Convention d'assistance de la société SEDD: Analyses physico-chimiques et microbiologiques.
2- Convention d'assistance de la société SOTULUB: Analyses et expertise des différents projets environnementaux de l'usine.

PROJETS DE COOPERATION INTERNATIONALE

1- **ENI CBC MED Programme: CEOMED:** ***2019-2022:*** Employing circular economy approach for OFMSW management within the Mediterranean countries.
2- **Laboratoire Mixte International (LMI): 2ème phase:** ***2019-2023:*** LMI COSYS-MED: Contaminants et écosystèmes marins sud méditerranéens
3- **Projet ARIMNet2: PYRODIGEST:** ***2018-2021:*** Conversion of olive oil wastes through combined pyrolysis and anaerobic digestion: energy, value added product and eco-fertilizers production.
4- **ARIMnet2-D4Declic:** ***2018-2020:*** Dual cropping system, Genetic Diversity, Decision support and Digital tool for Designing Eco-efficient Cereal-Legume Integrated food value Chain in the Mediterranean Basin
5- **Projet ERANETMED: BIOGASMENA**: ***2017-2020:*** Demonstration of dry fermentation and optimization of biogas technology for rural communities in the MENA region.
6- **Projet PEER-USAID:** ***2017-2020:*** Partnerships for Enhanced Engagement in Research (PEER): Evaluation of algal treatment options for olive mill wastewater to produce energy and biofertilizer.
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- **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..

9- **Projet Tuniso-Japonais SATREPS:** ***2016-2021:*** Valorization of Bio-resources based on Scientific Evidence in Semi- and Arid Land for Creation of New Industry..

10- **MERITE: «Urbanized bays-Sfax bay»:** ***2016-2020:*** Marine Ecosystem Response to the Input of conTaminants in the coastal zonE**.**

PROJETS COLLABORATIFS NATIONAUX

- **Projet PRF**: ***2018-2020:*** Développement d'un éco-procédé pilote de culture de micro-algues pour la séquestration de carbone, le traitement des eaux usées et la production de biocarburant. Le LBPE est l'équipe coordinatrice.
- **Projet PRF**: ***2018-2020:*** 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. Le LBPE est une équipe partenaire.
- **Projet VRR:** ***2017-2020:*** Valorisation de sous-produits de l'industrie oléicole par la production d'antioxydants et de biogaz vers une application industrielle à Sidi Bouzid. Projet avec la Société AGRITEX, Sidi Bouzid.
- **Projet MOBIDOC (Post-doc)-ANPR:** ***2018-2020:*** Valorisation agronomique du phosphogypse par culture des plantes médicinales sur phosphogypse et suivi des concentrations des métaux lourds dans les huiles essentielles de ces plantes et dans le phosphogypse. Organisme Bénéficiaire: Tunisian Indian Fertilizers, Usine TIFERT site de Skhira-Sfax.
- **Projet MOBIDOC (Post-doc)-ANPR:** ***2018-2020:*** Production des molécules bioactives à partir des sous-produits d'olivier pour prévenir la maladie de diabète type-2 et l'obésité. Utilisation des procédés d'encapsulation et de compression. «PhytoPLANT» spécialisée dans la production de compléments alimentaires.
- Implication dans le **Projet PAQ-Collabora:** ***2018-2020:*** Développement de produits biotechnologiques innovants à intérêt industriel: «Biotech-INNOV».

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
Yosra 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	PDoc	CBS
Ines Ayedi	PDoc	CBS
HèlaMkaouar	PDoc	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

Il s'agit d'une continuation des activités sur la synthèse de molécules surfactantes (butylcellobioside et butyl glucoside) grâce à la capacité de la beta glucosidase de *F. solani* et détermination de la structure chimique des molécules synthétisées en collaboration avec d'autres laboratoires de la FSS et de l'étranger. Les tensioactifs restent la principale catégorie d'ingrédients pour les produits de soin et sont des produits adoucissants qui devraient connaître une croissance des plus fortes. Ils entrent dans la composition des shampooings, produits de rinçage capillaire, bains moussants, gels douches, crèmes, laits de beauté, crèmes à raser, produits de maquillage, produits solaires, dentifrices, gels hydro-alcooliques etc…

La recherche de nouvelles molécules tensioactives est très demandée surtout la recherche des molécules biodégradables. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressées à la synthèse des alkylglucosides. Ces molécules sont des bio-tensioactifs biodégradables, non ioniques, composées de deux parties une partie hydrophile « un sucre » et une partie hydrophobe « dérivée d'alcool gras».

La synthèse est menée par une β-glucosidase (FBgl1) de *Fusaruim solani*. Deux réactions de synthèse sont étudiées : la première réaction en utilisant le glucose et le butanol comme substrat, la deuxième réaction en utilisant le cellobiose et le butanol. Les produits de chaque réaction ont été purifiés et identifiés par la résonance magnétique nucléaire (RMN). Deux molécules sont identifiées qui sont le sec-butyl-β-D-glucoside et le sec-butyl-β-D-cellobioside. Cette dernière molécule est une nouvelle molécule qui n'a jamais été synthétisée ni par voie chimique ni enzymatique et qui présente une tension de surface de 26 mN/m et une concentration micellaire critique (CMC) égal à 250 mg/L.

Nous envisagerons l'incorporation de ces molécules dans des produits de soin et la synthèse d'autres molécules biotensioactives.

II- Valorisation d'une cellulase fongique et un cocktail enzymatique dans la formulation d'un détergent commercialisé

Certaines salissures d'origine biologique ne peuvent être éliminées ni par l'action des tensioactifs ni par l'action des agents de blanchiment. Pour les enlever, il faut recourir à un processus biochimique

obtenu en introduisant des enzymes dans les détergents. Ce sont des biocatalyseurs puissants produits par des organismes vivants (champignons et bactéries) et capables de dégrader rapidement et à basse température les salissures de nature biologique. Le présent travail entre dans le cadre du projet MOBIDOC-POSTDOC intitulé : « Valorisation d'une cellulase particulière dans la formulation d'un détergent commercialisé », au sein de la société SODET et du Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS). Ce projet vise à développer des cocktails enzymatiques efficaces pour les détergents liquides des lessives pour machine produites par la société SODET et à valoriser le jus enzymatique de notre souche fongique locale «*Stachybotrysmicrospora* » et en particulier une cellulase particulière « EG1 » (enzyme étudiée lors de mes travaux de thèse) dans la formulation de détergent lessive linge machine liquide.

Nous avons entamé un programme de production des enzymes de la souche A19 de *S. microspora* (cocktail enzymatique) et la cellulase purifiée EG1. Ainsi, nous avons réalisé des fermentations répétées suivies de séparation par centrifugation. La concentration des enzymes produites a été effectuée par lyophilisation. Afin de purifier EG1 avec une production améliorée, nous avons suivi la cinétique de production de cette cellulase par des cultures à différentes concentrations de glucose (1%, 3%, 4% et 5%) et à pH8. Après optimisation, nous avons produit et concentré la cellulase EG1 contenue dans le jus enzymatique de *S. microspora* sur glucose 1%, pH8. Pour améliorer la stabilité de cette enzyme avant formulation dans le détergent, nous avons entamé un programme d'immobilisation d'EG1 sur le chitosane et nous avons optimisé la concentration de glutaraldheyde (0.5, 1, 2, 3 et 4%) et la quantité d'enzyme. Cette technique n'était pas réussie car la cellulase immobilisé a dû dégrader le chitosane.

Ainsi, nous nous sommes eus recours à l'étude de l'effet de l'ajout des stabilisateurs à différentes concentrations (glycérol et NaCl). A la base de ces résultats, nous sommes passés à la formulation des enzymes préparées (EG1 et le cocktail enzymatique A19). Puis, nous sommes passés à la caractérisation biochimique des nouvelles enzymes formulées. Enfin, nous avons introduit ces nouvelles enzymes dans Det machine liquide et nous avons comparé le pouvoir de détergence des EG1 et cocktail enzymatique A19 avec les enzymes commerciales. Ces derniers résultats montrent une adéquation encourageante entre nos enzymes localement produites et les propriétés recherchées par la société.

III- Continuation des travaux biochimiques et moléculaires sur les pectinases de la souche CT1

Dans le cadre de nos activités sur les pectinases fongiques, nous avons réussi deux constructions, une première construction de la polygalacturonase PG2 dans le vecteur d'expression *pET21*, afin d'être exprimée dans le système bactérien; et une deuxième construction de la pectin lyase dans le vecteur d'expression *pPICZαC*, afin d'être exprimée dans le système eucaryote *Pichia pastoris*. Nous avons aussi entamé la purification d'une pectin lyase du mutant CT1 de *Penicillium occitanis*, après avoir optimisé les conditions d'expression de cette dernière.

Dans une deuxième partie du travail, et afin de déterminer la nature de la mutation et répondre à la question essentielle, si la mutation obtenue est bien responsable de la surexpression constitutive des pectinases chez *Penicillium occitanis* (« phénotype CT1»), nous avons commencé l'insertion de cette mutation qui a changé un G en C dans un facteur de régulation transcriptionnelle, chez la souche sauvage (CL100) de *P. occitanis* en suivant la démarche « Split marker recombination » pour la disruption du gène candidat et la réinsertion du site muté..

IV- Faisabilité de la trans-estérification de la matière végétale verte et non oléagineuse en biodiesel

Avec la TTL, lipase fongique à forte activité galactolipase identifiée, il a été possible de produire directement à partir de feuilles d'arbres, soit des acides gras libres par hydrolyse, soit des

esters méthyliques par alcoolyse. L'alcoolyse a été particulièrement étudiée en termes de cinétique, de rendement et de sélectivité en esters. Un taux de conversion élevé de 92% après 24h a été obtenu avec le méthanol (R 1/6), à 37 °C dans 60% d'hexane et en présence de la TTL immobilisée.

Le procédé de transestérification « in situ » encore appelée 'Extraction réactive' est une nouvelle alternative pour la production des esters méthyliques en une seule étape utilisant directement la biomasse comme matière première. Les étapes d'extraction et de transestérification in situ se faisant simultanément, ce qui permet d'éviter les étapes lourdes d'extraction et permet d'économiser en terme de temps du processus.Ce processus a été largement utilisé pour la transestérification de la biomasse microalguale et aussi pour la transestérification des graines oléagineuses. Néanmoins et à notre connaissance, il n'y a encore pas d'autres informations sur la transéstérification des galactolipides de la biomasse verte jusqu'à maintenant. Ainsi,aprèsune étape de prétraitement enzymatique (par des xylanases, des cellulases et des pectinases), la transéstérification dans le chloroforme comme co-solvant, avec un excès de méthanol (R1/9) et en utilisant la TTL immobilisée (900 U), les galactolipides des feuilles vertes sont totalement convertis en moins de 24 h. Cette étude pourrait ouvrir des nouvelles perspectives pour l'exploitation des galactolipides comme étant des lipides « de futurs » (article en cours de préparation).

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

Dans ce travail nous avons intéressé à la recherche d'inhibiteurs de la tyrosinase : une oxydoréductase qui est impliquée dans les deux premières étapes de la biosynthèse de la mélanine, afin de les utiliser comme moyens de prévention de la pigmentation que ce soit dans le domaine dermo-cosmétique ou dans le domaine agroalimentaire.

Nous avons commencé par un criblage des inhibiteurs de la tyrosinase à partir d'un groupe de molécules nouvellement synthétisées dérivés des composés Ferrocenyl-Aryl-Butene, donnés par une équipe avec qui nous collaborons. L'enzyme utilisée est une tyrosinase que nous avions caractérisée dans l'encre de seiche *Sepia officinalis* ; plus précisément dans le surnageant limpide issu de la centrifugation de l'encre. Nous avons trouvés 4 molécules inhibitrices de l'activité tyrosinase.

Puis nous avons étudié l'effet de Ferrociphénol sur la mélanogenèse dans des cellules de mélanome de souris B16F10 et nous avons trouvé que l'un des composés fait diminuer la quantité de mélanine, l'activité tyrosinase et l'expression de la tyrosinase dans les cellules B16F10. De plus un test in vivo a été effectué en utilisant des souris noires Black 57 et des embryons du poisson Zèbre. La quantité de mélanine et l'activité tyrosinases extraites à partir des embryons du poisson Zèbre ont été légèrement diminuées en présence de Ferrociphénol. L'étude de l'effet 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.

VI- Exploration de nouvelles sources d'azote lors de la culture de Stachybotrys et découverte d'un nouveau exo-polysaccharide secrété par cette souche

Se basant sur un article récent, nous avons testé des sources d'azote que nous n'avions pas exploré aupravant. Lors de la culture des champignons cellulolytiques chez la souche N1 de *Stacybotrys microspora*, RutC30 de *T. reesei* ainsi que N2-20 de *T. parceramosum* sur des sources classiques ( ) et nouvelles ( ), ces dernières ont donné d'excellents résultats en terme de niveau de production d'activités cellulasiques. De plus, une des sources d'azote a permis la mise en évidence de la sécrétion par la souche N1 de polymère polysaccharidique. Ceci rappelle le polymère sécrété par la souche de *P. occitanis* mais qui se faisait uniquement à une valeur de C/N élevée (supérieure à 20) ; par contre ici la souche N1 secrète le polymère à une valeur de C/N très normale. Ceci étant, ce même polymère est aussi secrété par la souche A19 en présence d'un rapport élevé en C/N.

<u>Projet 2 :</u> Potentialités fongiques en biotechnologie et bioénergies (Responsable : A. GARGOURI)

I- Production et la formulation de bio-insecticide fongique à base de spores du champignon *Beauveria bassiana*

Autre travail de recherche, qui est réalisé dans le cadre d'un projet Mobidoc consiste en la production et la formulation de bio-insecticide fongique à base de spores du champignon *Beauveria bassiana.* Le projet a commencé par l'optimisation de la production en masse des spores de la souche locale P2 de *B. bassiana* à petit échelle par fermentation semi solide (SSF). Parmi une dizaine de substrats, l'orge et le blé ont été retenus. Par la suite, la teneur optimale en eau était maintenue entre 50 et 60%. Les spores issues de la SSF de P2 ont été incorporées dans une formule en poudre mouillable.

Pour améliorer la solubilité de cette formule, l'ajout de différents surfactants a été testé. Les résultats ont montré que des surfactants non ioniques et même ioniques peuvent être utilisés sans affecter la viabilité des spores de P2. En se basant sur ces résultats, 3 formules ont été préparées pour des essais contre les moustiques et contre la mineuse de la tomate *Tuta absoluta*.

En utilisant une autre souche *B. bassiana* P1, l'optimisation de la production des blastospores a été amorcée en milieu liquide. Ces blastospores ont été incorporés dans différentes formules en poudre mouillable pour étudier leur stabilité en présence de différents additifs au cours du stockage à différentes température. En attendant le résultat de cette étude, une formule en suspension concentré est aussi envisageable.

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

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.

Les lipides fongiques

Les huiles microbiennes constituent une source importante de lipides et d'acides gras de haute valeur ajoutée pouvant être valorisée dans divers secteurs industriels. Les microorganismes oléagineux sont capables d'accumuler des lipides avec un taux supérieur à 20% de leur matière sèche. Les lipides microbiens sont constitués habituellement de 80 à 90% de triglycérides qui sont les précurseurs pour la production de biodiesel.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la production des lipides d'intérêt chez les champignons filamenteux oléagineux.

Dans un premier temps, une optimisation des conditions d'accumulations des lipides par deux souches fongiques CO8 (*Mucor circinelloides*) et E4-2 (*Fusariumverticillioides*) a été réalisée. L'évaluation de la qualité des lipides produits par les deux souches pour la production de biodiesel montre que ces huiles sont respectueusesdes normes standards. L'analyse de ces propriétés à l'aide de l'algorithme PROMETHEE-GAIA a montré que la souche CO8 cultivée sur la pâte de neutralisation de grignon d'huile de soja comme substrat carboné est la plus appropriée pour la production d'une bonne qualité 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 sur la production des lipides par la souche E4-2. Le mutant Δ*gut2-5* obtenu 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 teneurs en lipides totaux demeurent inchangées entre mutant et sauvage.

Les pigments d'origine fongique

Au cours des travaux effectués sur la production des lipides, nous avons constaté qu'en modifiant les paramètres de la culture, la souche E4-2 est capable de produire différents pigments en modifiant les paramètres du milieu de culture.

Les extraits colorés obtenus présentent un effet cytotoxique vis-à-vis des lignées cellulaires testées. L'analyse par HPLC et les spectres d'absorption de la fraction 5 (obtenue par fractionnement par CCM de ces extraits colorés) montre que ces substances correspondent vraisemblablement à la bikavérine.

III- Production de lipides d'intérêt par culture de levures oléagineuses : Exploitation et valorisation de déchets industriels

Les levures sont sans aucun doute le groupe le plus important de microorganismes exploités sur le plan biotechnologique par l'homme. Aujourd'hui, l'importance de la levure dans le secteur industriel est très largement basée sur la capacité de certaines levures à effectuer une conversion rapide et efficace des sucres ou des hydrates de carbone en divers métabolites à grande valeur ajoutée tels que de l'éthanol, des enzymes, des biosurfactants, des acides organiques, des antimicrobiens ou même des polysaccharides. Un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où elles ont développé une faculté d'adaptation à un grand nombre de niches écologiques grâce à leurs propriétés physiologiques très particulières. L'ingénierie de ces levures a donc trouvé dans l'industrie de la fermentation un champ d'application privilégié pour produire divers métabolites.

Parmi ces levures, on distingue celles utilisées pour leur aptitude à synthétiser et à accumuler de fortes teneurs en lipides généralement sous forme de triglycérides et d'esters de stérol. Cette famille de levure est dite oléagineuse ou lipogène. L'utilisation de ces levures pour la production des lipides d'intérêt est une alternative prometteuse de point de vue biotechnologique. Les lipides microbiens ont suscité un intérêt considérable ces dernières années en raison de leur caractère inoffensif et des possibilités de synthèse à grande échelle de molécules à haute valeur ajoutée comprenant des acides gras ou des dérivés. Ils présentent un potentiel valorisable en pharmacie, alimentation, biocarburants, cosmétiques, santé etc. Les procédés industriels centrés sur les lipides de levures oléagineuses en vue d'une production durable de carburants d'origine biologique sont intensément étudiés. Les lipides des levures oléagineuses contiennent principalement l'acide stéarique, oléique, linoléique ainsi que de l'acide palmitique. La prédominance de l'acide oléique dans le profil des lipides des levures oléagineuses est aussi rapportée dans celui des huiles végétales.

Ainsi, les lipides microbiens constituent des matières premières utilisables pour la production de biocarburants au même titre que les huiles végétales. De nos jours, les coûts de production de lipides microbiens sont plus élevés que ceux de la production d'huile végétale, car la technologie n'est pas encore complètement développée et le coût des milieux de culture reste élevé. Face à cette contrainte, de nombreuses alternatives ont été proposées. L'utilisation de sous-produits et de déchets de zones industrielles en tant que matières premières permettra de surmonter partiellement ce problème économique tout en offrant des moyens efficaces de recyclage des déchets polluants. En outre, la sélection de souches de levure plus résistantes (plus efficaces et plus résistantes aux polluants et aux inhibiteurs) et capables d'utiliser une large gamme de déchets industriels pourrait encore augmenter la rentabilité du processus de bioconversion.

Actuellement, les industries de fabrication du biodiesel génèrent sous formes de rejets valorisables une partie de la matière première, le glycérol brut. Le glycérol brut est un substrat osidique riche en carbone, méthanol, eau, savon, sel, alcool, huiles et matières organiques solides. Il contient également des traces de catalyseur non utilisé au cours du processus de trans-estérification. Dans les dernières années, le taux de production du glycérol brut a augmenté de 7,8 bilions litres en 2006 jusqu'à atteindre 36 bilions litres en 2018 donc des énormes quantités du glycérol brut seront générées dans l'avenir. L'étape finale de la production de biodiesel comprend une purification par lavage à l'eau chaude afin d'éliminer les résidus de catalyseur et autres impuretés. Toutefois, cette étape de purification est longue et coûteuse. Par conséquent, la valorisation de ce produit par un procédé biotechnologique, tel que la fermentation constitue une solution prometteuse pour résoudre les problèmes environnementaux liés au rejet de ce déchet.

Une des alternatives c'est de l'utiliser comme source de carbone dans le milieu de croissance des microorganismes oléagineux et ce dans le but de produire des lipides microbiens. Ces derniers peuvent par la suite réintégrer le processus de production de biodiesel ou être à l'origine d'autres transformations biotechnologiques. La nature hétérogène du glycérol brute fait de lui un substrat récalcitrant difficile à métaboliser. Peu de souches de levure oléagineuse, rapportées dans la littérature, ont montré l'efficacité de bioconversion du glycérol brut en lipides microbiens. La majorité de ces levures appartiennent au genre *Rhodosporidium*. Néanmoins, la sélection de nouvelles souches de levure (plus efficace et tolérante vis-à-vis d'une forte teneur d'impuretés) et opérant selon différents modes de culture conduira sans aucun doute à l'amélioration de la productivité en lipides microbiens. Après une caractérisation physicochimique un échantillon de glycérol brut industriel a été utilisé comme seule source de carbone dans les milieux de culture de 13 souches de levures oléagineuses. *Candida viswanathii* Y-E4 s'est démarquée des autres souches en produisant la quantité de biomasse et de contenu lipidique les plus élevés.

Les conditions de cultures ont été optimisées via une approche statistique basée sur le modèle Box-Behnken mettant en jeu trois variables indépendantes et ce afin d'augmenter le rendement en lipide microbien. La caractérisation du lipide obtenu a montré que la composition en acides gras et le profil lipidique étaient similaires à celui des huiles végétales, avec une prédominance d'acides gras à longue chaîne, en particulier d'acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique (45%). La détermination prédictive des propriétés du biodiesel suggère que cette huile peut être utilisée efficacement pour la production de biodiesel. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives dans l'utilisation de déchets industriels tels que le glycérol brut pour la production économique de lipides microbiens et de produits à haute valeur ajoutée.

IV- Étude moléculaire des gènes impliqués dans l'accumulation de lipides chez la levure Y-E4

L'augmentation du taux de production et de productivité des lipides par les microorganismes est assurée grâce à l'amélioration des procédés microbiologiques et le développement des outils du génie génétique. La surexpression des enzymes clés intervenant dans la synthèse des acides gras ou des lipides, la régulation négative du catabolisme des acides gras et l'inhibition de la voie de la β-oxydation forment un ensemble de modifications génétiques en vue de construire des mutants surproducteurs et exploitables à l'échelle industrielle. En prévision d'une éventuelle manipulation génétique de la levure *Candida viswanathii* Y-E4, nous nous sommes proposé d'étudier quelques gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des triglycérides. Le premier gène : le Diacyl-glycerol-acyl-transferase (DGAT) codant pour une enzyme intervenant dans la dernière étape de biosynthèse des triglycérides (acylation du DAG par un acyl-CoA pour former un TAG). Le deuxième gène : le Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPD) responsable de la conversion du DHAP en glycérol-3-

phosphate (G3P), précurseur de la biosynthèse *de novo* des triglycérides. Le troisième gène : le glycérol-3-phosphate déshydrogénase(GUT2), antagoniste du gène GPD, transforme l'excés du G3P en DHAP. Afin d'améliorer génétiquement la levure *Candida viswanathii* Y-E4, nous avons proposé de cloner et de sur-exprimer le gène DGAT. Un fragment de 1650 pb couvrant 96% du gène a été amplifié et séquencé.

L'étude du niveau d'expression montre que le gène DGAT est surexprimé en fonction du rapport C/N avec une surexpression maximale dans la condition C/N 100 avec un rapport de 29.16. Pour le gène GPD, son amplification par PCR génère un fragment de 1113pb qui englobe la totalité du gène. L'étude de l'expression relative du gène GPD en fonction du rapport C/N montre une légère augmentation de l'expression de ce gène à un rapport C/N 50 par rapport à la condition standard. Par contre à des C/N 100 et 200 l'expression du gène GPD est même plus faible que dans la condition standard. Pour le gène GUT2 antagoniste du gène GDP, nous avons amplifié un fragment de 340pb et l'étude de son niveau d'expression est en cours. Concernant la voie de dégradation des lipides, nous avons sélectionné le gène PEX10 (facteur de biogenèse peroxysomale) qui participe à la biogenèse des peroxysomes qui est le lieu de la β-oxydation et deux gènes acylCoA oxydase POX2 et POX5. Ces derniers catalysent l'étape limitante de la β-oxydation. La délétion de ces gènes devrait augmenter le taux de production des lipides par la souche Y-E4 par inhibition de la dégradation des lipides de réserve stockés dans les corps lipidiques. L'amplification des gènes PEX10, POX5 et POX2 par PCR donne des fragments de 490 pb, 400pb et 520pb respectivement, et l'étude de leur niveau d'expression est en cours.

V- Extraction des galactolipides et caractérisation de leurs propriétés interfaciales et bioactives

Nous envisageons d'étudier les potentialités naturelles des galactolipides extraits à partir de la biomasse algale verte comme étant des organismes photosynthétiques riches en galactolipides qui sont les constituants majeurs des chloroplastes.

Les galactolipides (MGDG et le DGDG) représentent presque 90% des chloroplastes répartis dans leurs membranes internes et externes ainsi que les thylakoïdes, nous avons choisi donc d'extraire directement une fraction enrichie en chloroplastes (FEC) au lieu de traiter la totalité de la biomasse algale (des lipides totaux). Le concept de ce protocole est basé sur un choc osmotique afin d'induire une rupture cellulaire puis un éclatement des chloroplastes par un solvant binaire pour obtenir un extrait lipidique qui ne renferme que les galactolipides (article en cours de préparation).

La composition chimique de MGDG et le DGDG de la macro-algue verte *Ulvaalctuca*a été étudiée, après leur purification, par GC/MC et montre une richesse en acides gras polyinsaturés (AGPI). Ces deux classes de glycéroglycolipides avaient une composition presque identique d'acide gras, mais présentaient des différences significatives dans la teneur en certains acides gras. Parmi ces AGPI on trouve l'acide hexadecanoique, l'acide linoléique (C18:2 n-6), l'acide linolénique (C18:3) ($\Delta^{9,12,15}$), l'acide eicosapentaenoique (C20:5 n-3) et l'acide stearidonique (C18:4 n-3) (pour les DGDG seulement). Cette étude révèle que les galactolipides de cette macro-algue sont riches en acides gras à longues chaînes polyinsaturées avec une teneur globale considérable en acide linolénique (C18:3). Ces derniers sont très recherchés dans diverses applications industrielles, alimentaires et médicales. Malgré l'intérêt que peuvent présenter les galactolipides par leur abondance dans la biomasse végétale verte, leur contenu en acides gras polyinsaturés reste très difficile à récupérer. L'utilisation des enzymes lipolytiques ayant une activité spécifique à ces galactolipides et qui sont les galactolipases (Belhaj et *al.*, 2018) permet d'envisager la libération de ces acides gras libres, majoritairement polyinsaturés, sans avoir recours aux produits chimiques.

Etant donné qu'elles sont constituées d'une tête hydrophile (un ou deux unités de galactose) et une queue hydrophobe (deux longues chaines d'acides gras), les galactolipides sont considérées comme des molécules amphiphiles. Nous envisagerons donc d'étudier leurs propriétés interfaciales et surfactantes.

VI- 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 ABCfongiqueet l'identification de tous les membres de la superfamille des protéines ABCà partir du génome de *Penicillium occitanis*.

Dans un premier temps, des expériences de PCR et de criblage de la banque génomique du mutant CT1 de *P. occitanis* ont été menées afin d'isoler la totalité du gène codant pour ce transporteur. De plus, la séquence du génome de *P. occitanis* récemment déterminée a permis de vérifier et de compléter la séquence isolée. L'analyse moléculaire montre que ce transporteur présente une grande homologie avec la sous famille des PDR avec la structure $[NBD\text{-}TMD_6]_2$ d'où son nom *Podr1*. Les transporteurs appartenant à cette sous-famille sont le plus souvent associés à la résistance aux antifongiques. Les structures secondaires du transporteur *PoDR1* ont été prédites par modélisation, par le programme «Swiss-Model Server», en utilisant comme modèle la structure de la protéine*ABCG2* humaine (PDB: 6hij.1) qui partage le pourcentage d'identité le plus élevé avec notre protéine. Les deux moitiés N- et C-terminal de notre protéine ont été traitées séparément sur la matrice "6hij.1". Les résultats de la modélisation génèrent 7 modèles avec les meilleures identités avec la matrice. Par conséquent, les deux premiers modèles (le modèle 1: allant de Ser860 à Val1489 et le modèle 2: allant d'Ala144 à Ile805), qui partagent respectivement 23,22% et 30,22% d'identité avec la matrice ont été choisis. Les deux modèlesont été superposés en un seul polypeptide pour construire l'architecture complète du transporteur *PoDR1*.

Par ailleurs, le mode d'interaction entre le transporteur *PoDR1* et le ligand ont été étudié à l'aide de deux programmes « SwissDock et Patchdock » en prenant comme ligand le cycloheximide (cet agent antifongique est rapporté comme étant un substrat potentiel pour plusieurs membres de la sous-famille des PDR).Ces deux programmes génèrent tous les modes de liaison possibles pour le ligand choisi et les solutions ayant les scores les plus élevés ont été considérées comme des interactions significatives.

En outre, des expériences de Southern blot réalisées dans les conditions stringentesmontrent que ce gène est probablement présent en monocopie dans le génome de CT1. Cependant, d'autres gènes non homologues peuvent exister dans le même génome et qui ne peuvent pas être détectés par hybridation avec la sonde correspondant au gène *Podr1*en raison des conditions strictes de l'hybridation. Notant que d'autres champignons ont plusieurs gènes codant pour des transporteurs ABC, ce qui nous a incités à rechercher d'autres gènes codant pour les protéinesde cette superfamilledans le génome de*P. occitanis*.

Une deuxième partie du travail a été donc consacrée à l'identification de tous les membres de la superfamille des protéines ABC dans le génome de *P. occitanis*. Pour ce faire, deux méthodes de criblage ont été adoptées :

- Dans la première, une recherche contre le génome de *P. occitanis*a été réalisée, par BLASTN, en présence d'une séquence consensus préparée sur la base du gène Podr1.

- Dans la deuxième, une recherche contre les 11249 séquences protéiquesde*P. occitanis* a été réalisée en utilisant le programme HMM (Hidden Markov Model) du logicielHMMER et le motif ABC_tran (Pfam 00005) des protéines ABC.

Le criblage initial par BlastN et HMM a permis d'isoler respectivement 76 et 53 séquences. Des analyses plus approfondies de toutes ces séquences a permis d'identifier un total de 58 protéines appartenant à la superfamille des ABC. Parmi les 58 protéines ABC identifiées, 51 ont au moins un TMD et un NBD et sont considérées comme des protéines membranaires. Les sept autres protéines dépourvues de TMD sont des protéines solubles. L'analyse phylogénétique a permis de classer les 58 protéines prédites en cinq sous-familles, dont: 12 ABCB, 24 ABCC, 1 ABCE, 5 ABCF, 15 ABCG et 1 protéine appartenant au groupeCaf16-like des protéines ABC non classées.

Une autre partie a été consacrée à l'inactivation du gène *Podr1*. Deux mutants (ΔPodr1-21 et ΔPodr1-16) 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.

VII- Optimisation de la production du peptide antifongique AcAFP hétérologue Chez *Pichia. pastoris*

Le peptide antifongique AcAFP suscite de plus en plus d'intérêt en raison de son potentiel énorme comme étant un nouveau composé biopharmaceutique pour les industries de la santé humaine et animale, ainsi que pour son application en agriculture conventionnelle et biologique. Les travaux antérieurs ont montré la défaillance du système d'expression procaryote *E. coli* BL21 pour la production de notre peptide sous sa forme active.En effet, le peptide AcAFPrecombinantpurifié à homogénéité a montré une activité antifongique faiblement exprimée en la comparant avec celle nativement exprimée chez *Aspergillus clavatus*.

Afin de continuer nos travaux dans le cadre de développer des stratégies de surproduction du peptide AcAFP, nous avons procédé àl'expression du peptidedans la levure*Pichiapastoris*. La levure est un système d'expression qui associe à la fois les avantages qu'offrent d'une part un système procaryote (niveau d'expression élevé, facilité de manipulation et milieu de croissance simple et peu coûteux) et d'autre part un système eucaryote (réalisation des modifications post-traductionnelles, repliement correct et sécrétion sous forme soluble de la protéine recombinante).

Pour ce faire,l'expression des formes peptidique de l'AcAFP à savoir la forme large de 172 pbet la forme mature de 154 pb(délétée six acides aminés : DESAVQ), a été conduite dans la levure méthylotrophe*Pichiapastoris* et en utilisant le vecteur pPICZαC de taille 3.6 Kb, contenant le gène *Sh ble* qui confère la résistance à l'antibiotique Zéocine , l'α-factor pour la sécrétion et un promoteur fort inductible par le méthanol.

Pour l'optimisation de la production, plusieurs facteurs majeurs affectant la croissance cellulaire et l'induction du peptide d'intérêt, seront choisis pour cette étude dont la composition du milieu de culture et la température de l'inductionetc...

Parallèlement, nous conduisons avec des partenaires socio-économiques des essais effectués en plein champs et sous des conditions contrôlées pour combattre la fusariose du blé de quelques cultures maraichères avec des différentes doses de notre peptide antifongique natif.

VIII- Isolement et identification d'une ribotoxine fongique sercrétée par le champignon filamenteux *Aspergillus clavatus*

La souche locale VR1 d'*Aspergillus clavatus* s'est avérée être capable de secréter, en plus de activité antifongique, une activité ribonucléasique induisant une hydrolyse complète et spécifique des ARNs(acides nucléiques totaux de différentes souches fongiques testées)après une incubation à température ambiante de l'extrait enzymatique brut, pendant 60 min . Par le biais du présent travail, nous avons purifié la protéine responsable de cette activité à homogénéité, en suivant uniquement deux étapes. La première étape de purification se fait via le chauffage de l'extrait enzymatique extracellulaire brut à 100°C pendant 15min suivi d'une centrifugation à 6000 rpm pendant 20min afin

de précipiter les protéines thermolabiles. La deuxième étape de la purification est assurée par HPLC moyennant une colonne cationique (mono S).

Le séquençage NH2-terminale, a permis l'identification de 18 résidus : NH2-AATWTCMNEQKNPKTNKY, présentant une forte homologie de séquence, comprise entre 83% à 100% avec l'α-sarcine et la c-sarcine secrétées respectivement par *Aspergillus giganteus* et *A. clavatus* d'où le nom « VR-RNAse » de notre ribonucléase.La caractérisation biochimique préliminaire de la VR-sarcine montre une forte thermostabilité, cependant notre ribotoxine s'avère très sensible à l'action des protéases à sérine, secrétées par notre souche *A. clavatus* VR, chose qui n'a jamais été mentionnée dans la littérature pour le reste des ribotoxines. Cette sensibilité aux protéases est observée uniquement si les deux protéines à savoir, la VR-sarcine et la protéase, sont incubées à une température comprise entre 50 et 70°C, température optimale à l'action de la protéase à sérine.

Le séquençage nucléotidique suivi par la comparaison entre la séquence nucléotidique du fragment génomique et celle du cDNA du gène de la ribotoxine de la souche VR1 obtenu, révèlent un gène constitué d'une ORF de 626 bp interrompue par un intron unique of 62 bp riche de 38 nucléotides Adenine. Notre ribotoxine "VR-sarcine" semble être un nouveau variant de la famille des ribotoxines fongiques puisqu'elle montre une forte homologie de séquence de 98% avec la "C-sarcine".

Nous comptons, suite à ces résultats prometteurs, approfondir la caractérisation biochimique de cette nouvelle ribotoxine afin de mieux exploiter ses potentialités dans divers domaines à intérêt biotechnologique. En effet, des études récentes d'une part dans le domaine de la recherche sur le cancer impliquent des immunotoxines à base de ribotoxines et d'autres part, leur rôle récent en tant qu'insecticide et biopesticides a été bien mis en évidence.

IX- purification et la caractérisation d'une polyphenoloxidase à partir de truffes Algériennes

En collaboration avec des collègues Algériens Farouk Benaceur et Hicham Gouzi ainsi qu'avec Aref Neifar, nous avons contribué à la purification et la caractérisation d'une polyphenoloxidase à partir de truffes Algériennes *Terfezia arenaria* ainsi qu'à partir de dates royales en plus de la démonstration de l'inhibition de son brunissement enzymatique par l'emploi de l'indole-3-acetic acide.

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

I- Développement d'un kit de détection d'auto-anticorps sériques anti-p53

Dans le cadre d'un projet Post-MobiDoc, nous avons entamé le développement d'un kit de détection d'auto-anticorps sériques anti-p53 pour une meilleure prise en charge des patients atteints de Cancer .

En effet, les altérations du gène suppresseur de tumeur p53 et de son produit d'expression, la protéine p53, constituent l'événement génétique le plus fréquent, tous cancers humains confondus.
La recherche d'anticorps sériques anti-p53 par test ELISA constitue une méthode simple et peu coûteuse de mise en évidence des altérations du gène p53. Elle est rendue possible du fait d'une auto-immunisation de certains patients atteints de cancer en réponse à l'accumulation intra-tumorale de protéine p53. Il est important de rappeler que connaitre le statut de P53 (mutante ou sauvage) chez un patient a un impact majeur en tant que facteur pronostic. De plus, l'identification du statut mutationnel de P53 chez les patients a un impact important car elle permet de prévoir la réponse aux traitements conventionnels et donc un traitement adapté s'impose.

En effet, la P53 mutante devient totalement ou partiellement inapte à exercer ses fonctions en tant que facteur de transcription pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et activer la mort cellulaire par apoptose. Dans ce contexte, la protéine P53 humaine a été exprimée dans le système eucaryote *Pichia Pastoris* dans notre Laboratoire. Notre projet consiste donc à développer un test ELISA basé sur la

protéine P53 recombinante qui sera utilisée comme antigène pour la détection des auto-anticorps anti P53 dans le sérum de patients atteints de différents types de cancer. Parallèlement, nous envisageons d'utiliser un moyen rapide et efficace basé sur la quantitative PCR –ARMS afin de déterminer les mutations somatiques « hot spot » touchant le gène P53 chez les patients produisant les auto-anticorps anti-P53. Cette partie sera réalisée chez l'organisme bénéficiaire (Société ABS) qui est spécialisé dans le diagnostic moléculaire en Oncologie.

Nous avons réussi à sélectionner un clone à intégration multiple qui servira pour la production de la P53 recombinante qui servira d'antigène pour la détection des auto antiP53 sériques chez les patients atteints de différents cancers. Ensuite, la souche recombinante sélectionnée a été cultivée dans un milieu BMGY et l'induction du promoteur a été réalisée dans un milieu BMMY en ajoutant du méthanol (0.5%) chaque 24h pendant 2 jours.

Dans une seconde partie, nous avons poursuivi le travail avec l'extraction des protéines intracellulaires à partir du culot cellulaire et l'extraction des protéines extracellulaires à partir du surnageant. Les protéines ainsi extraites sont fractionnées par SDS-PAGE et la visualisation de la protéine P53-His recombinante est faite par western blot.

Après confirmation de la présence de la protéine d'intérêt, nous avons procédé à une Culture à grande échelle du clone recombinant déjà sélectionné pour entamer ensuite l'optimisation de la purification de la protéine recombinante sur colonne HisTrap (Amersham de 1ml) par chromatographie d'affinité. En parallèle, nous avons commencé la Collecte des prélèvements sanguins auprès des services de Radiothérapie et d'Oncologie Moléculaire du CHU Habib Bourguiba et par la suite, le Traitement de ces échantillons biologiques et conservation des sérums à -80°C.

II- NGS et cancer du sein/ovaire héréditaire

Afin de mieux explorer les patientes avec un cancer sein/ovaire héréditaires qui sont BRCA négative, nous avons réalisé un séquençage d'exome clinique chez 9 individus provenant de 9 familles différentes et présentant un score d'Eisinger relativement élevé.
Un aliquot de 50 ng d'ADN (basé sur la quantification de Qubit) a été utilisé pour préparer la banque. La capture de l'exome a ensuite été effectuée en utilisant le kit : **« Trusight One Sequencing Panel series Kit (Illumina, USA) »** qui permet de séquencer les exons de 4800 gènes associés à des maladies génétiques humaines y compris le cancer

Les séquences obtenues sont comparées et alignées au génome humain de référence (GRCh37 / hg19) à l'aide du package d'alignement Burrows-Wheeler (BWA). L'analyse des données NGS à l'aide du BaseSpace Variant Interpreter (https://basespace.illumina.com) est en cours de réalisation.

Par ailleurs, nous avons poursuivi l'analyse des gènes BRCA1/BRCA2 par NGS (Kit Ampliseq BRCA) sur Miseq (Illumina) sur 96 patientes appartenant à des familles non apparentées. L'analyse des résultats est en cours de réalisation. L'objectif de ce travail, outre la mise en évidence du spectre mutationnel BRCA1/BRCA2 associé au cancer sein/ovaire héréditaire, est l'apport d'un conseil génétique aux membres sains des familles chez qui le cas index s'avère positif pour une mutation BRCA constitutionnelle délétère. Pour cela, nous prévoyons l'analyse par séquençage de Sanger des individus appartenant aux familles présentant des mutations délétères au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2.

III-Analyse Moléculaire de marqueurs décisionnels pour la chimiothérapie

En dépit des avancées spectaculaires faites pour le dépistage, le diagnostic et la thérapie, le cancer demeure parmi les pathologies qui causent le plus de décès dans le monde. Au cours des dernières décennies, d'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés avec le développement et

l'application de traitements de médecine personnalisée visant à corriger les anomalies moléculaires impliquées dans le développement tumoral.

Les thérapies ciblées ont pour objectif de bloquer la croissance ou la propagation de la tumeur, en interférant avec partenaires moléculaires qui sont à l'origine du développement ou de la dissémination des cellules cancéreuses. Elles sont adaptées en fonction des caractéristiques morphologiques et moléculaires de la tumeur.

Ainsi, afin d'établir un protocole thérapeutique spécifique à chaque patient, l'oncologue doit être guidé par des tests moléculaires qui reflèteront les altérations génétiques dans le tissu tumoral.

En Tunisie, les tests moléculaires permettant d'adapter le protocole thérapeutique ne sont pas réalisés systématiquement pour tous les patients. Il existe plusieurs kits de diagnostic moléculaire commercialisés, mais ces derniers coûtent très cher, ce qui rend l'analyse moléculaire inaccessible à la majorité des patients Tunisiens atteints de cancers. La plupart de ces tests sont donc réalisés l'étranger, ce qui représente une contrainte pour le patient en termes de coût et de temps.

Dans le cadre d'un projet Mobidoc Postdoc, nous avons développé des tests moléculaires « maison » permettant de détecter, à moindre coûts, des mutations ou remaniements génétiques spécifiques de plusieurs cancers, comme le cancer des poumons, le cancer colorectal, les mélanomes et les neuroblastomes. Les gènes RAS, EGFR, BRAF, ALK, N-MYC ainsi que le statut MSI ont été choisi comme cibles de notre travail, puisqu'ils sont fortement impliqués dans les choix thérapeutiques des cancers cités.

Durant cette année, et après avoir terminé la mise au point des modalités de collecte des échantillons de cancer colorectal, du poumon et du mélanome (analyse des blocs FFPE, détermination du pourcentage de cellules tumorales, mode d'échantillonnage…), nous avons collecté des échantillons de cancer colorectal, du poumon (CBNPC) et de mélanome cutané et nous avons réalisé les extractions des acides nucléiques pour 25 cas de CRC, 19 cas de CBNPC et 3 cas de mélanomes.

Nous avons par la suite mis au point et validé des conditions expérimentales pour la recherche des mutations L858R, T790M et del19 dans le gène EGFR, V600E dans le gène BRAF ainsi que les mutations au niveau des codons 12, 13, 59 et 61 de KRAS et NRAS.

Nous avons aussi conçu des oligonucléotides marqués spécifiques et nous avons validé les conditions expérimentales pour l'analyse de l'instabilité des séquences microsatellites dans le cancer colorectal.

Nous avons jusque-là trouvé des taux de mutations variables selon le type cancer étudié
Dans le cancer colorectal, nous avons analysé 25 échantillons en utilisant la technique « maison » et les kits commerciaux en parallèle, nous avons trouvé un taux de mutations RAS de 63% alors que les échantillons étaient tous sauvage pour BRAF.

Pour le cancer bronchopulmonaire, nous avons analysé 19 échantillons tumoraux pour l'EGFR et seuls 11% des échantillons étaient mutés. L'analyse des mutations de RAS au niveau de ces échantillons est en cours de réalisation.

Les 3 échantillons de mélanomes cutanés analysés pour les mutations de BRAF se sont avérés de type sauvage.

La confrontation de nos résultats obtenus par nos kits « maison » à ceux obtenus avec les kits commerciaux Therascreen pyro kits (QIAGEN) a montré des résultats très encourageants avec une bonne concordance entre les 2 résultats.

Concernant l'instabilité des séquences microsatellites dans le cancer colorectal, nous avons analysé jusqu'à maintenant 2 échantillons qui se sont avérés stables. La confirmation des résultats est faite en comparaison avec ceux obtenu par la technique d'immuno-histochimie.

La réalisation de ce projet a permis d'instaurer, à Sfax et au sud Tunisien, les techniques de recherche moléculaires de ces mutations, afin d'adapter le traitement aux besoins du malade. Outre la

disponibilité de la technique, nous offrirons aussi à nos patients la possibilité d'accéder à ces analyses avec des coûts plus adaptés à leurs situations financières.

IV-Micro-ARNs et cancer du nasopharynx (NPC)

La découverte des micro-ARNs, comme une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique, a suscité un grand intérêt dans la recherche scientifique, qui n'a cessé de croître durant ces dernières années. En effet, les données actuellement disponibles sur ces petits ARN non codants a permis de mieux caractériser les mécanismes oncogéniques mis en œuvre de différents types de cancer et par conséquent de définir de nouveaux bio-marqueurs utiles pour le diagnostic et/ou de nouvelles cibles pour une thérapie innovante.

Dans l'objectif d'examiner la dérégulation de l'expression de certains micro-ARNs au cours du développement du NPC, nous avons mené une étude comparative entre les échantillons tumoraux (n=63) et les échantillons non tumoraux de la muqueuse nasopharyngée normale (n=10). Comme prévu, notre analyse a montré un taux d'expression significativement plus important des trois micro-ARNs BARTs dans les tumeurs NPC, en comparaison avec le groupe témoin (ratio > 347 et p < 0.002). Ce résultat est également observé dans d'autres études réalisées, principalement, à partir des malignités épithéliales associées à l'EBV.

Il s'agit de produits EBV qui contribueraient à l'oncogenèse via le maintien de la latence virale, la survie des cellules hôtes, et/ou l'échappement immunitaire. La surexpression du miR-BART1, BART 7 ou BART 9 favoriserait la migration et l'invasion des cellules NPC in vitro et la métastase tumorale in vivo. Les mécanismes moléculaires sous-jacents par lesquels ces micro-ARNs BARTs provoqueraient des métastases tumorales se révèlent à l'inhibition directe du principal suppresseur de tumeur PTEN (cas des miR-BART1 ou miR-BART7) et de la protéine transmembranaire E-cadhérine (cas de miR-BART9) (Cai, Ye et al, 2015). De même, notre analyse comparative a montré une répression relativement plus importante du miR-145 au cours du développement du NPC (ratio=0.34 ; p=0.048). Ce résultat confirme des travaux antérieurs menés in vitro qui ont montré moyennant des approches de surexpression ou d'inhibition le rôle du miR-145 dans la répression de la prolifération et la migration des cellules NPC en ciblant notamment ADAM17 et FSCN1 (Wu et al, 2015 ; Li et al, 2015).

Tenant compte de la variabilité de l'expression des micro-ARNs dans les biopsies tumorales de NPC, nous avons analysé la répartition des niveaux d'expression de chaque micro-ARN en fonction des paramètres clinico-pathologiques à savoir l'âge, le type histologique et le stade TNM. Notre analyse préliminaire a montré une expression significativement moins importante de miR-145 dans les tumeurs indifférenciées UCNT, en comparaison avec celle peu ou moyennement différenciées.

L'expression différentielle de miR-145 en fonction de l'histologie de la tumeur est en accord avec des données antérieures suggérant la dissemblance de certaines propriétés oncogéniques entre les deux types histologiques.

Dans l'objectif d'évaluer l'apport des marqueurs de types micro-ARNs dans le diagnostic et le suivi des malades atteints de NPC, nous nous sommes intéressés à analyser l'expression de cinq micro-ARNs, miR92, miR-22, miR200C, miR-145 et miR-34 dans des prélèvements plasmatiques provenant de malade NPC et également de sujets normaux. Actuellement, nous disposons de 42 prélèvements pré -thérapeutiques et également 12 autres réalisées après une la chimiothérapie d'induction basée sur les molécules de Docétaxel, Cisplatine et 5FU. Notre analyse préliminaire a montré que le miR-92 est significativement plus abondant dans les prélèvements pré -thérapeutiques de NPC en comparaison avec les sujets normaux (ratio 6.29 ; p 0.01). Par ailleurs, l'analyse comparative entre les prélèvements pré / post –thérapeutiques a montré des fluctuations des taux des micro-ARNs, principalement du miR-92 et miR-22. L'interprétation de ces résultats est fixée après au moins un an de recueil et ce afin de

déterminer l'évolution clinique de la maladie moyennant les examens cliniques et radiologiques appropriés.

Le rôle de l'oncoprotéine virale LMP1 dans la dérégulation de l'expression de certains micro-ARNs a fait l'objet de plusieurs travaux récents. Parmi ces micro-ARNs, nous citons par exemple la surexpression de miR-155, miR-146 et de miR-29b qui favoriseraient l'échappement au système immunitaire inné et/ou la survie cellulaire plus importante. De même, dans un travail antérieur réalisé au sein de notre équipe, nous avons souligné le rôle de cette protéine virale dans la surexpression de l'oncomiR miR-10b (Allaya et al, 2015) .

Afin de mieux caractériser la relation entre LMP1 et le développement du NPC, nous nous sommes intéressés à déterminer l'éventuel rôle de LMP1 dans la dérégulation de l'expression des trois micro-ARNs cellulaires analysés miR-200a, miR-145 et miR-22. Il s'agit d'une étude comparative de l'expression des micro-ARNs entre des cellules nasopharyngées exprimant LMP1 (NP69-LMP1) et des cellules témoins (NP69). La transfection de ces cellules par le gène LMP1 qui a été réalisée par Lo et al, (2003) a montré des changements morphologiques et moléculaires remarquables en faveur d'une capacité invasive plus importante. En effet, notre analyse par RT-QPCR a montré une nette diminution de l'expression de miR-200a dans les cellules exprimant LMP1, en comparaison avec les cellules témoins. Dans l'objectif de vérifier l'éventuel rôle de LMP1 dans l'hyperméthylation de la région 5' du gène hsa-miR200a qui expliquerait la réduction de l'expression de ce micro-ARN, nous avons choisi de traiter les cellules NP69-LMP1 par l'agent déméthylant (5-aza-déoxycytidine) à 5, 10 et 50 µM et par l'inhibiteur des histones déacétylases (iHDAC) (Panobinostat) à une concentration de 100nM. Notre analyse par RT-QPCR a montré une augmentation significative des taux d'expression de miR200a dans les cellules traitées par la 5-aza-déoxycytidine, en comparaison avec les cellules non traitées.

De même, il est intéressant de signaler que le traitement des cellules à 10 uM de 5-aza-déoxycytidine et à 100 nM de panobinostat a montré des taux d'expression relativement plus importants par rapport aux cellules traitées par l'agent déméthylant seul ou l'iHDAC seul. L'ensemble de ces données *in vitro* ont permis de conclure que l'oncoprotéine virale LMP1 inhiberait l'expression de miR200a probablement via la dérégulation du programme épigénétique et plus particulièrement la méthylation aberrante dans la région 5' du gène hsa-miR200a.

V-Etude de la clonalité lymphocytaire dans les hémopathies lymphoïdes malignes.

Cette étude vise à identifier les proliférations monoclonales des lymphocytes B ou T par l'étude des réarrangements géniques des chaines d'immunoglobulines et du récepteur TCR selon les directives européennes du projet *Euroclonality / BIOMED-2 ; BMH4-CT98-3936*. Actuellement, ces tests de clonalité génique ont fait preuve d'un grand intérêt pour le diagnostic multidisciplinaire des hémopathies lymphoïdes et également pour le suivi de la maladie résiduelle. Ce projet vient de démarrer en collaboration avec nos collègues médecins des CHU Habib Bourguiba et Hédi Chaker de Sfax.

Notre analyse moléculaire préliminaire des loci IGH et IGK a montré une corrélation avec les données anatomopathologiques. Il s'agit d'un profil monoclonal dans quatre prélèvements tumoraux (LAL, lymphome de Hodgkin, lymphome B à grande cellule et lymphome de la zone marginale) et plutôt polyclonal dans les deux prélèvements témoins (hyperplasie lymphoide réactionnelle et tumeur myfibroblastique inflammatoire).

VI- Sélection et caractérisation de molécules anti-thrombotiques à visée thérapeutique contre les pathologies cardiovasculaires:

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de décès dans le monde. L'athérosclérose est l'une des principales causes de ces pathologies pouvant se compliquer par une rupture soudaine de la plaque d'athérome entraînant l'activation plaquettaire et la formation de

thrombus. Ce dernier aboutit à l'occlusion progressive des vaisseaux d'où l'apparition des MCV tel que l'infarctus du myocarde et l'AVC ischémique. Etant donné la mortalité et l'impact socioéconomique élevé de ces maladies, leur gestion demeure un défi majeur.

Le traitement est en premier lieu préventif, par conséquent, un contrôle précis de la fonction plaquettaire est impératif. C'est pour cette fin que les antiagrégants sont utilisés. Il en existe plusieurs types agissant de manière spécifique en inhibant les différentes voies de l'agrégation plaquettaire. Néanmoins, ces médicaments présentent plusieurs effets secondaires tels que le risque d'hémorragie et les troubles gastro-intestinaux.

Il serait très intéressant, dans le cadre de ce projet, d'identifier de nouveaux antiagrégants par le criblage de molécules à partir d'une chimiothèque. A cet effet, nous avons mis en place, dans une étude antérieure effectuée dans notre laboratoire, une technique d'agrégation plaquettaire sur microplaque ayant servi pour le criblage d'une série de molécules synthétisées par voie chimique. A l'issue de cette étude, nous avons pu identifier une dizaine de molécules capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP.

a- Validation du pouvoir antiagrégant de molécules de nature chimique:

Afin de vérifier et confirmer les résultats antécédents, nous nous sommes proposés de déterminer le pouvoir anti-agrégant de ces molécules par la méthode d'agrégomètrie photométrique, considérée comme le test de référence pour l'exploration fonctionnelle plaquettaire. Pour ce faire, nous avons étudié l'agrégation plaquettaire en utilisant le PRP de donneur sain et en présence de ces molécules après activation par l'ADP. Nous avons validé l'effet antiagrégant pour les neuf molécules et nous avons déterminé la concentration optimale inhibitrice de l'agrégation.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet antiagrégant de certaines molécules en présence de différents agonistes et nous avons remarqué que les molécules B1 et B2 inhibent sévèrement l'agrégation induite par le collagène mais elles n'affectent pas l'agrégation induite par l'acide arachidonique. Quant à la molécule B3, elle montre une agrégation réversible après induction par l'ADP, le collagène et l'acide arachidonique. Il était aussi intéressant de tester l'effet des molécules sur la coagulation, la deuxième étape de l'hémostase, c'est pourquoi nous avons déterminé le temps de Quick et le temps de Céphaline activée permettant d'exploiter respectivement la voie extrinsèque et intrinsèque de la coagulation. Nous n'avons pas observé d'effet notable des molécules sur la coagulation. Ce résultat est encourageant puisque c'est intéressant d'identifier des molécules à action spécifique ciblant une étape précise de l'hémostase.

b- Etude de l'effet de meilleures molécules sur la sécrétion et l'activation plaquettaire:

Nous avons étudié l'effet de certaines molécules sur la sécrétion des granules alpha et denses des plaquettes, comme nous avons étudié l'effet sur l'activation du complexe GPIIb-IIIa plaquettaires et ce, par cytométrie en flux. Nous avons montré que les deux molécules B1 et B2 inhibent l'agrégation plaquettaire, en inhibant à la fois l'activation du complexe GPIIb-IIIa et la sécrétion du contenu des granules α et denses.

c- Evaluation de la sureté des molécules à pouvoir antiagrégants de point de vue cytotoxicité et potentiel hémolytique:

Etant donné l'application thérapeutique potentielle de nos molécules dans la prévention des maladies cardiovasculaire, nous avons envisagé de tester leur effet sur les globules rouges et leur cytotoxicité sur les plaquettes ainsi que sur des lignées cellulaires. Nous avons montré que toutes les molécules n'ont pas d'effet hémolytique notable. Nous avons montré aussi que plusieurs molécules n'ont pas d'effet toxique sur les plaquettes à la concentration optimale inhibitrice de l'agrégation plaquettaire. La cytotoxicité a été testée sur la lignée cellulaire MCF7 et Hek293. Nous avons remarqué que certaines molécules ne sont pas cytotoxiques à la concentration optimale inhibitrice de l'agrégation plaquettaire alors que d'autres sont cytotoxique même à des faibles concentrations. Le potentiel antioxydant de ces molécules d'intérêt a été testé pour montrer que l'ensemble de ces

molécules ne présentent pas de pouvoir antioxydant. Nous avons pu conclure que le pouvoir antiagrégant de ces molécules est indépendant du potentiel antioxydant.

Ce projet a été réalisé en étroite collaboration avec le laboratoire d'hématologie de la faculté de médecine de Sfax. Certaines analyses ont été réalisées à l'institut des maladies métaboliques et cardiovasculaire à Toulouse, équipe avec laquelle nous collaborons et nous avons des résultats très encourageants (article en cours de rédaction). Nous envisageons réaliser des explorations plus poussées afin de déterminer le mode d'action des meilleures molécules en étudiant surtout l'état d'expression des protéines clé impliquées dans la signalisation plaquettaire en parallèle avec des analyses de lipidomique permettant d'identifier et quantifier les lipides et les phospholipides plaquettaires après traitement par nos molécules. L'identification de nouveaux antiagrégants nous permettra d'entamer des études pharmacologiques, en vue de mettre sur le marché un produit efficace et sans effets secondaires, contrairement aux molécules déjà commercialisées.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Liste des publications internationales parues en 2019:

1. Nihel Ammous-Boukhris, Amor Mosbah, Wajdi Ayadi, Emna Sahli, Soizic, Chevance, Arnaud Bondon, Ali Gargouri, Michele Baudy-Floc'h & Raja Mokdad-Gargouri : B12: a novel peptide interacting with the extracellular loop of the EBV oncoprotein LMP1. *Scientific Reports* 2019 Mar 13;9(1):4389. 9:4389

2. Ines Barkia, Hanen Ketata Bouaziz, Tahiya Sellami Boudawara, Lotfi Aleya, Ali Faouzi Gargouri, Nazamid Saari. Acute oral toxicity study on Wistar rats fed microalgal protein hydrolysates from Bellerochea malleus. *Environmental Science and Pollution Research.* 2019 Jan [Epub ahead of print].

3. Salma Abdeljalil, Ines Borgi, Sandra Carvalho, Lamia Jmal-Hammami, Ali Gargouri. Molecular and bioinformatic data reveal two differentially-expressed intracellular GH1 β-glucosidases from the rare and alkalophilic fungus *Stachybotrys microspora*. *Gene.* 2019 Jun 30;703:134-144.

4. Benaceur Farouk, Gouzi Hicham, Meddah Boumediene, Neifar Aref, Gargouri Ali. Purification and characterization of catechol oxidase from Tadela (*Phoenix dactylifera* L.) date fruit *International Journal of Biological Macromolecules* Volume 125, 15 March 2019, Pages 1248-1256

5. Akermi N, Mkaouar H, Kriaa A, Jablaoui A, Soussou S, Gargouri A, Coleman AW, Perret F, Maguin E, Rhimi M. (2019) para-Sulphonato-calix[n]arene capped silver nanoparticles challenge the catalytic efficiency and the stability of a novel human gut serine protease inhibitor. *Chem Commun (Camb).* 2019 Aug 7;55(61):8935-8938. doi: 10.1039/c9cc03183a.

6. Ayadi I, Belghith H, Gargouri A, Guerfali M. (2019) Utilization of Wheat Bran Acid Hydrolysate by *Rhodotorula mucilaginosa* Y-MG1 for Microbial Lipid Production as Feedstock for Biodiesel Synthesis. *Biomed Res Int.* 2019 Dec 12;2019:3213521. doi: 10.1155/2019/3213521.

7. Emna Ketata Haitham Elleuch, Are fNeifar, Wafa Mihoubi, Wajdi Ayadi, Naziha Marrakchi, Farhat Rezgui, Ali Gargouri (2019) Anti-melanogenesis potential of a new series of Morita-Baylis-Hillman adducts in B16F10 melanoma cell line.*Bioorganic Chemistry*.2019 March;84:17-23.

8. Aicha Kriaa, Mélanie Bourgin, Aline Potiron, Héla Mkaouar, Amin Jablaoui, Philippe Gérard, Emmanuelle Maguin, and Moez Rhimi (2019): Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *Journal of Lipid Research.*2019 Feb;60(2):323–332.

9. Mohamed Guerfali, Ines Ayadi, Nadia Mohamed, Wajdi Ayadi, Hafedh Belghith, Maria Rosário Bronze, Maria H.L. Ribeiro, Ali Gargouri. Triacylglycerols accumulation and glycolipidssecretion by the oleaginousyeastRhodotorulababjevae Y-SL7: Structural identification and biotechnological applications.*Bioresource Technology.* 2019 Feb;273:326-334.

10. Héla Mkaouar, Nizar Akermi, Aicha Kriaa, Anne-Laure Abraham, Amin Jablaoui, Souha Soussou, Raja Mokdad-Gargouri, Emmanuelle Maguin, Moez Rhimi. Serine protease inhibitors and humanwellbeinginterplay: new insights for oldfriends.2019 Aug 30;7:e7224.*doi: 10.7717/peerj.7224. eCollection 2019.*

11. Dorra Ben Ayed‐Guerfali, Emna Dabbeche‐Bouricha, Wajdi Ayadi, Fatma Trifa,Slim Charfi, Abdelmajid Khabir,Tahia Sellami‐Boudawara, Raja Mokdad‐Gargouri. Association of FOXA1 and EMT markers (Twist1 and E-cadherin) in breast cancer.*MolecularBiology Reports.* 2019 Jun;46(3) :3247-3255.

12. Omama Kamoun, Gangatharan Muralitharan, Hafedh Belghith, Ali Gargouri, HelaTrigui-Lahiani. Suitable carbon sources selection and ranking for biodiesel production by oleaginous Mucor circinelloides using multi-criteriaanalysisapproach.*Fuel*.Volume 2571 December 2019 Article 116117.

II/ Liste des brevets d'invention (INNORPI, PCT et autres) acceptés en 2019

1/Inventeurs : Amor Mosbah, Nihel Ammous, Yosra Amara, Soukaina Abdelwahed, Chaima Jlassi, Mouna Mahjoubi, Olfa Bousselmi, Alaeddine Redissi, Olfa Mghirbi, Yasmine Souissi, Mohamed Neifar, Habib Chouchane, Raja Gargouri, Ahmed Sleheddine Masmoudi, Imene Oouzari, Ali Gargouri, Ameur Cherif

Titre : Procédé écologique de traitement des eaux contaminées par des colorants, des éléments radioactifs, des pesticides, des toxines, par des peptides fixateurs des contaminants.

Référence : ***INNORPI sous le N°: TN 2018/0146*** *en date du* 26 Avril 2018.

FORMATION DIPLOMANTE

I/ Liste des thèses soutenues en 2019

Sihem Ben Abid: Isolation via Phage Display of P53 targeting peptides Essays of modulation of the apoptotic function of the tumour suppressor protein. Thèse soutenue le 3 Juillet 2019 à la FSS.

Ines Ayadi : Production de lipides d'intérêt biotechnologique par culture de levures oléagineuses : approche microbiologique et moléculaire. Soutenue le 13 Juillet 2019 à la FSS

Hèla Mkaouar : Rôle des serpines, inhibiteurs de protéases à sérine, du microbiote digestif humain dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Soutenue le 25 Juillet 2019 à l'ENIS

Omama Kamoun : Les lipides et les pigments d'origine fongiques : production et application biotechnologique. Soutenue le 6 Septembre 2019 à la FSS

II/ Liste des Mastères soutenus en 2019

Leila Elhadj Ahmed : ***Caractérisation de molécules chimiques à potentialité antiagrégante des plaquettes.*** Soutenue le 13 Décembre à la FSS

III/ Liste des PFE soutenus en 2019

Ahlem Daghari : Biosynthèse et purification des oligo-esculines par la beta glucosidas ede Fusarium solani. Soutenue le 18 Juin à l'ISBS

Nawel Slimani : Méthodes de purificataion des molécules anti-apoptotiques de *Nigelle sativa* chez la levure et leurs effets antioxydants. Soutenue le 19 Juin à l'ISBS

Mariem Zaidi : Biosynthèse de Bio-détergent par la beta –glucosidase de *Fusarium solani*. Soutenue le 17 Juin à l'ISET de Sfax.

PROJETS DE COOPERATION INTERNATIONALE

Un Projet de recherche dans le cadre de la coopération bilatérale universitaire Tuniso – Française (PHC-Utique) pour l'année 2019 intitulé « Identification d'inhibiteurs de la trypsine-3, cible thérapeutique pour le traitement du syndrome de l'intestin irritable » sous le code 19G 0819.

PROGRAMMES NATIONAUX

Deux Projets d'Encouragement des Jeunes Chercheurs acceptés en 2019 :

- **Mohamed Guerfali** :« Bioconversion des déchets industriels en lipides microbiens à usage chimique et énergétique » code du projet : 19PEJC05-10 (2019-2021).
- **Wajdi Ayadi** : « Intérêt de l'étude de la clonalité lymphocytaire par réarrangements géniques dans le diagnostic et le suivi des hémopathies lymphoïdes malignes » 19PEJC06-11.

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 Khedher	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 :

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

BUPM55 est l'une des souches appartenant à la collection de souches de *B. thuringiensis* productrices des cristaux parasporaux qui a été récemment isolée au sein du Laboratoire des Biopesticides au CBS. Dans le cadre de la recherche et l'identification de nouveaux gènes ayant des activités insecticides intéressantes, trois nouveaux gènes *cry* de type *cry30*, *cry50* et *cry54* ont été identifiés chez cette souche. Ainsi, par différentes techniques d'identification : clonage, séquençage et alignement, ces gènes ont montré une originalité par rapport à ceux publiés.

Dans le cadre de l'étude de ces nouveaux gènes, nous avons cloné les deux gènes *cry30Gr* et *cry50Br* dans le vecteur pET-28a sous contrôle du promoteur fort T7 de l'opéron *lac*Z inductible à l'IPTG. Par la suite, nous avons transféré les constructions pET*cry50Br* et pET*cry30Gr* dans la souche d'*E. coli* BL21 pour étudier leurs expressions hétérologues. En effet, sur gels SDS-PAGE, nous avons mis en évidence l'expression des gènes *cry30Gr* et *cry50Br* chez *E. coli*. De plus, afin d'étudier l'expression homologue des gènes *cry30Gr* et *cry54Br*, nous avons mis en évidence l'expression de ces deux delta-endotoxines par analyse des profils protéiques sur gel SDS-PAGE des transformants. Ces résultats nous permettront comme travaux ultérieurs de purifier nos protéines et de les caractériser.

En conclusion, ces trois gènes sont non seulement une nouvelle source dans la recherche de nouveaux spectres d'activités larvicides ; mais aussi, ils peuvent être utiles pour surmonter les cas de résistance chez les moustiques et les insectes nuisibles dans le monde entier aux toxines couramment utilisées.

1-2-Purification des spores/cristaux de B. thuringienis israelensis :

Pour purifier les spores/cristaux de B. thuringienis israelensis, la meilleure condition constatée

dans les travaux antérieurs, était la sonication (30 min à 70kHz) qui permet d'éliminer presque la totalité des agrégats (95%) mais élimine aussi l'exosporium. Ainsi, dans le but de surmonter ce problème nous avons soniqué l'homogénat de la souche BUPM98 à différents temps et avec différentes fréquences, pour voir qu'elle est la condition adéquate qui permet d'éliminer les agrégats sans altérer l'intégrité de l'exosporium. L'observation microscopique nous a montré que l'élimination des agrégats est proportionnelle à l'augmentation de la fréquence et du temps de sonication. Cependant, les agrégats persistent à 30% avec un traitement de 30 min à 60 kHz. Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du SDS sur l'intégrité des cristaux de la souche LIP (Spp. kurstaki) pour cela, nous avons resuspendu le mélange spores/cristaux dans du SDS 2% et nous l'avons incubé pendant 2 h à 37°C. L'observation microscopique a montré que la forme et la taille des cristaux reste intacte. Nous avons donc choisi la concentration 2% pour tester l'effet du SDS sur la dissociation des agrégats de la souche BUPM98. Puis, nous nous sommes proposé de tester l'effet combinatoire de la sonication et du SDS sur la dissociation des agrégats de la souche BUPM98. En conclusion la combinaison de ces deux traitements constitue un outil efficace pour surmonter le problème d'agrégation dans les souches israelensis.

2-Bioinsecticides actifs contre les lépidoptères

2-1 : Mise en évidence de l'activité insecticidede des souches BLB1 et LIP contre *Phyllocnistis citrella* et *Prays citri*

Les souches BLB1 et LIP 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. Ainsi, nous avons fixé comme objectif le développement de deux nouveaux biopesticides actifs contre les parasites des agrumes et d'assurer leur maturité technologique vers le marché. Pour cela, nous avons vérifié la toxicité de ces deux souches, au laboratoire et en plen champ, contre les deux principales larves des agrumes, *Phyllocnistis citrella* et *Prays citri :*

Tests au Laboratoire : Cette tâche concerne la détermination des activités insecticides de BLB1 et LIP et conduira à définir le potentiel des souches contre les larves de *Phyllocnistis citrella* et *Prays citri* par rapport à la souche de référence HD1. Les résultats obtenus montrent une relation claire effet-dose pour les deux souches étudiées BLB1 et LIP et ont permis d'estimer la DL50 entre 70 et 100 µg / mL.

Essais au Champ : Les résultats obtenus sont très prometteurs et ont montré un effet comparable du produit non optimisé à base de BLB1 aux biopesticides commerciaux lorsqu'il est appliqué sur *P. citrella*.

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

Un gène codant une toxine Cry a été cloné à partir d'un isolat de *B. thuringiensis* nommé BUPM14 qui représente une forte ressemblance avec la souche BNS3 subsp. *kurstaki*. Le gène a été séquencé et la séquence a été déposée dans la banque de données NCBI. La comparaison de la séquence obtenue avec celles déposées dans la banque de données NCBI a montré une homologie de 90% avec le gène *cry1c* de Bt. Elle a aussi révélé certaines différences qui pourront dégager des différences au niveau de la structure en acides aminés. Une faible expression de la toxine correspondante a été obtenue lorsque le gène a été cloné dans le vecteur d'expression chez *Escherichia coli*, pBAD. Un nouveau clonage a été fait dans le vecteur d'expression chez *Escherichia coli*, pET. De même, l'expression n'a pas pu être améliorée. Ainsi, nous avons opté pour un changement de la souche d'*Escherichia coli* (Top10, Bl21 et T7 express), mais sans aucune amélioration. En conséquence, des optimisations des conditions de culture et d'induction ont été réalisées. Une légère expression a été ainsi observée. D'autres optimisations sont en cours.

Un curage plasmidique de la souche BUPM14 a été entamé dans le but d'obtenir une souche totalement curée. Cette dernière servira pour la localisation du gène en question. Des souches partiellement curée ont été obtenues. Une poursuite du curage à totalité est en cours.

Un test de toxicité de la souche BUPM14 a été fait contre les larves du lépidoptère *Agrotis segetum* au stade L2. La mortalité a été comparée à celles de deux souches de références, à savoir, la souche de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 et la souche de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* HD133. La mortalité a été comptée pour trois doses de toxines (0,5 ; 1 et 5 µg/mL) et a été suivie pendant 4 jours. La souche BUPM14 a montré une toxicité prometteuse qui se traduit par une mortalité légèrement plus élevée que celle des deux autres souches de référence dès le deuxième jour du test et surtout au quatrième jour.

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

Etude de l'effet des rayons UV sur InhA1 : L'effet des rayons UV sur la stabilité d'InhA1 a été aussi étudié en exposant cette dernière pendant 15, 30 et 60 min à l'UV. La LC50 obtenue suite ce traitement est de l'ordre de 402.96 ng/cm2. L'exposition à l'UV a légèrement réduit la puissance larvicide de la métalloprotéase InhA1 indiquant la sensibilité de cette dernière à ces rayons. De ce fait, la protéase InhA1 montrant une activité larvicide contre E. kuehniella, peut résister à des contraintes environnementales telles que la température et l'UV. Ces propriétés peuvent être exploitées pour la formulation d'un bioinsecticide pour un contrôle efficace des larves de lépidoptères.

Expression hétérologue et toxicité d'InhA2-216 : Nous avons réussi l'expression hétérologue de la métalloprotéase InhA2-216 chez E. coli, ceci a été vérifié par Western Blot en utilisant des anticorps polyclonaux anti-inhA. Par la suite nous avons étudié l'activité insecticide de cette protéine contre les larves du lépidoptère ravageur Agrotis ipsilon. Les tests de toxicité ont été réalisés avec la métalloprotéase InhA2-216 purifiée donnant une LC50 de 546 ng/cm2 et par les cellules soniquées de la souche recombinante exprimant cette protéine donnant une LC50 de 1914 ng/cm2. La purification a amélioré presque 3 fois la toxicité d'InhA2-216 contre A. ipsilon.

2-4- Production économique des biopesticides à base de Photorhabdus temperata

Nous nous sommes intéressés à la production économique des biopesticides à base de *P. temperata*, en utilisant les eaux usées des industries agroalimentaires (WS1, WS2, WS3, WS4 et WS5). Ainsi, nous avons montré, que ces effluents peuvent supporter la croissance, ainsi que la production de toxines insecticides par la souche K122 de *P. temperata*. De plus, la culture dans les eaux usées permet de maintenir la viabilité cellulaire de ces cellules. En effet, l'analyse de l'état physiologique des cellules par cytométrie en flux a montré que seulement 0,8% des cellules de *P. temperata* cultivées dans WS4 sont mortes après une incubation prolongée de 72 h. Similairement, celles cultivées dans le milieu complexe, utilisé comme contrôle, demeurent viables (IP-) après les différents temps d'incubation (24, 48 et 72 h). Dans la suite de ce travail, une analyse du nombre total de cellules, de la CFU et de la toxicité lors de la croissance de la souche K122 de *P. temperata* dans les différentes eaux usées a été réalisée afin d'établir une relation mathématique possible entre tous ces paramètres. Les résultats obtenus ont montré que, quel que soit le milieu utilisé, la relation entre le nombre total de cellules et la CFU est conforme à la loi de puissance (CFU = a (Total cell count) ^{b}). Par conséquent, il est possible de calculer la CFU dans chaque milieu, en connaissant que le nombre total de cellules. L'établissement de la relation entre le nombre total de cellules et la toxicité a montré qu'elle suit la loi logarithmique (Total cell count = a Ln (Toxicité) + b). De même que la relation entre la CFU et la toxicité, qui est de la forme (CFU count = a Ln (Toxicité) + b). Par conséquent, pour estimer la production de bio-insecticides de *P. temperata* au cours de la fermentation, on pourrait utiliser la relation linéaire entre le nombre de cellules, Ln (Toxicité) et la CFU, Ln (Toxicité). Ainsi, une détermination rapide de la numération cellulaire totale au microscope ou de la capacité des cellules à former des colonies pourrait être une méthode utile pour prédire l'entomotoxicité de *P. temperata*. Cependant, ces équations ne doivent être utilisées que pour suivre la production de bio-insecticides au

cours de la fermentation ou pour estimer la toxicité orale maximale de *P. temperata* obtenue après 48 h d'incubation. Toutefois, les essais biologiques restent la méthode de choix pour obtenir une valeur réelle de la toxicité.

2-5- Etude biochimique et activité insecticide de l'extrait enzymatique de la bactérie Serratia marcescens sur le criquet pèlerin Schistocerca greagaria

Le travail entre dans le cadre d'enrichir la gamme des agents de lutte biologique contre le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria*. Les recherches entamées l'année dernière sur le potentiel insecticide de la bactérie *S. marcescens*, qui a été isolée sur des larves d'élevage du criquet, ont montré des résultats promoteurs. L'étude de l'activité insecticide de l'extrait enzymatique a révélé une mortalité qui peut atteindre 66,66% à faible dose. De plus, nous avons montré que l'extrait enzymatique de la bactérie a affecté le système digestif de l'insecte en lui causant des perturbations post ingestives et une diminution de la prise de nourriture et du poids des larves. Par ailleurs, une purification des protéases en tant que facteurs responsables de l'activité insecticides a été entamée. La purification consiste en une précipitation par le sulfate d'ammonium suivie par des chromatographies sur gel filtration et échangeuse d'ions. Une électrophorèse des différentes fractions sur gel de polyacrylamide et un zymogramme ont donné 3 formes protéasiques de 25 kDa, 40 kDa et 75 kDa. La purification serait poursuivie et les protéines qui seront purifiées à la totalité seront sujettes de caractérisation biochimique.

2-6- Formulation de nouveaux bioinsecticides à base d'huiles essentielles

Les grains et graines entreposés subissent de multiples agressions de la part d'insectes appartenant à l'ordre des coléoptères lors du stockage et de la conservation. Ces coléoptères peuvent être répartis en deux groupes : (i) Les ravageurs primaires s'attaquent à des grains intacts dont *Sitophilus oryzae* (L.) et (ii) Les ravageurs secondaires capables de s'attaquer les grains qu'à partir des ouvertures causés par les ravageurs primaires servant de voies d'accès, dans ce cas de ravageurs secondaires on retrouve le *Tribolium confusum* (Duv.). Dans une étude antérieure, nous avons sélectionné 4 huiles essentielles actives sur deux insectes. Dans cette étude, nous avons cherché à vérifier l'existence de relations de synergie ou d'antagonisme entre les différentes huiles essentielles quant à la toxicité contre tribolium et Sitophilus. **Ainsi, nous avons** mélangé les huiles essentielles de P1, P2, P3 et P4 (différents combinaisons) en se basant sur les doses toxiques prédéfinies préalablementet testé l'activité de chaque combinaison sur les deux insectes. Cette étape a permis de retrouver une relation d'antagonisme entre les huiles essentielles de P3 et P4. C'est-à-dire En présence de P4 l'efficacité de P3 est réduite de 90% à 40%. Par contre, deux combinaisons ont montré une efficacité au-delàs de 90% ont étés sélectionnées pour poursuivre l'étape de formulation : Combinaison 1 (20% P1+ 50% P3), Combinaison 2 (15% P1+ 5% P2 + 50% P3).

2-7- Recherche de souches entomopathogènes d'actinomycètes

Parmi les isolats dotés d'activité antifongique, certains seraient des actinomycètes selon leurs aspects morphologiques et culturaux. Ces microorganismes sont connus pour la production des antibiotiques mais quelques souches ont été rapportées comme productrices d'activités bioinsecticides très intéressantes. Par conséquent, des bio-essais de l'activité insecticide contre les larves L1 du lépidoptère ravageur *Agrotis ipsilon* ont été réalisés en rajoutant le surnageant de culture bactérienne à la nourriture des larves. Aucune inhibition significative n'a été détectée.

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

1- Protection de la tomate contre la verticilliose :

Nous nous sommes intéressés à l'exploitation du caractère endophyte, des traits PGP et du pouvoir antifongique chez les *B. thuringiensis*, connus par leur activité insecticide afin de rendre leur

utilisation systémique dans les plantes d'un grand intérêt agronomique. Les souches de *B. thuringiensis* étudiés ont montré une aptitude à coloniser les différentes organes de la tomate, à améliorer la croissance des plantules de tomate ainsi qu'à protéger les fruits de tomate contre la verticiliose. Plusieurs traits ont été suivis chez les souches de *B. thuringiensis* afin de sélectionner la meilleure souche. Toutefois, un recours vers l'utilisation des analyses en composantes principales (ACP) a été utilisé afin d'étudier d'une part, la corrélation entre les différentes traits testés et d'autre part, de cribler les plus importants traits à utiliser afin de sélectionner un agent de biocontrôle et de biofertilisant. L'antibiose et la production de biofilms sont considérées les traits les plus importants à étudiés afin de sélectionner un agent de biocontrôle. Quant à sélection d'un agent promoteur de croissance, la production de l'AIA présente le trait à considérer pour cette sélection. Les deux souches BUMP134 et MEB2 ont été démontrées pour être les plus efficaces pour la bioprotection des fruits de tomate.

2-Mise au point d'un milieu économique pour la production de biofongicides à base d'une souche de de *Bacillus velezensis.*

Pour une production efficace du biofongicide à base de *Bacillus velezensis*, nous nous sommes focalisés dans un premier temps à mettre au point un milieu économique et à optimiser les conditions de production. En vue de mettre au point un biofongicide à bon marché, nous avons procédé à la sélection des composants du milieu économique qui peuvent contribuer considérablement au coût de production.

Un plan de criblage a été réalisé pour le criblage des composantes du milieu fermentaire et des conditions de fermentation. Six variables ont été choisies, 15 expériences ont été testées et la densité bactérienne a été déterminée expérimentalement pour chaque expérience. Suite à l'analyse des résultats du plan de criblage, trois variables ont été choisies pour la réalisation d'un plan d'expérience. Le modèle Box-Behnken a été appliqué afin d'étudier les interactions entre ces différents facteurs et de déterminer la valeur optimale de chaque variable pour une production optimale de la bactérie.

A l'issue de ces travaux, un milieu économique permettant une production optimale de biofongicide à base de *Bacillus velezensis* a été obtenu. La production, à petite échelle, de la bactérie dans les conditions optimisées a été suivie au cours du temps. Le rendement de la sporulation ainsi que le rendement en métabolites antifongiques ont été évalués. Par la suite, le scale-up de la production de la bactérie a été étudié et les conditions ont été ajustées en fonction de l'augmentation de l'échelle de production. Nous avons constaté alors un niveau de production constant. Comme suite à ce travail, la stabilité du biofongicide à base de *Bacillus velezensis* ainsi que son efficacité au champ seront étudiées.

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

Le travail a consisté à isoler des isolats bactériens principalement de types *Bacillus* spp. à partir d'échantillons de sols accompagné du test de l'activité antifongique contre 3 espèces de champignons : *Fusarrium culmorum*, *Fusarium graminerum* et *Alternaria alternata.* L'identification est réalisée par séquençage partiel de l'ADNr 16S.

Ensuite, la recherche des opérons codant les métabolites secondaires iturine, surfactine, fongicine et bacillomycine par des amplifications PCR via les couples d'amorces ituC/ ituD, FenD/FenCEA, SrfA/SfP et BamyB-F/BamyB-R a permis d'évaluer le potentiel des différentes souches isolées. La caractérisation des métabolites responsables de l'activité antifongique nécessite la purification et l'évaluation de son activité inhibitrice contre des champignons phytopathogènes. Leur identification structurale entre dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire spécialisé à l'étranger.

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

1-Etude de l'interaction *in vitro* entre la souche de biocontrôle 32a de *Bacillus amyloliquefaciens* et les souches phytopathogènes *d'Agrobacterium tumefaciens* et d'*Erwinia amylovora*

L'interaction de la souche de 32a de *B. amyloliquefaciens* avec les souches phytopathogènes C58 et B6 *d'A. tumefaciens* et *E. amylovora* a été investiguée. L'étude de la croissance des souches phytopathogènes en co-culture avec la souche 32a a montré une diminution considérable de leurs densités à l'exception de la souche B6. La plus forte activité antibactérienne est observée contre *A. tumefaciens* C58 suivie de celle contre *E. amylovora*. Aucune activité n'a été détectée contre la souche B6 d'*A. tumefaciens*.

L'étude de la production des trois familles de lipopeptides a montré des différences entre les différentes confrontations. Nous avons également montré l'expression différentielle des gènes *fenD, bamyB* et *bacA* codant pour la fengycine, la bacillomycine et le dipeptide bacilysine. Ces résultats suggèrent la modulation de la production des lipopeptides d'une manière spécifique selon la bactérie phytopathogène en interaction.

2-Etude des facteurs influant la production des composés antibactériens de la souche 32ade *Bacillus amyloliquefaciens* contre les bactéries phytopathogènes *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia amylovora*

Dans le cadre de la mise au point d'un biopesticide composé des métabolites de la souche 32a, nous nous sommes proposés d'étudier les facteurs les plus influant sur la production des composés antibactériens dirigées contre les bactéries phytopathogènes *Agrobacterium tumefaciens* et *Erwinia amylovora*. Nous avons pu montrer que le milieu MC est le plus adéquat pour la production des composés antibactériens.

Les optimisations préliminaires utilisant ce milieu de production ont montré que l'utilisation du lactose et l'extrait de levure en tant que sources de carbone et d'azote et une agitation dans des erlenmeyens « sans baffles » assurent une meilleure activité antibactérienne. Ces conditions ont été par la suite utilisées pour l'application de la méthodologie du plan d'expérience de type Plackett-Burman pour la détermination des facteurs les plus influant lors de la production des composés antibactériens par la souche 32a. Les résultats obtenus ont montré que la durée de la culture, la température, le lactose et l'extrait de levure présentent les effets les plus importants sur l'activité antibactérienne contre les deux souches phytopathogènes.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Publications internationales parues en 2019:

1. Mhaya A, Bégu D, Tounsi S, Arpin C. (2020) MgrB inactivation is responsible for acquired resistance to colistin in Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii. Antimicrob Agents Chemother.. doi: 10.1128/AAC.00128-20.
2. 2. Mhaya A, Trabelsi R, M'Zali F, Bégu D, Tounsi S, Gdoura R, Arpin C.(2020) First description of NDM-1-positive Klebsiella pneumoniae in the Tunisian community. J Glob Antimicrob Resist. 21:49-50. doi: 10.1016/j.jgar.2020.02.023.
3. Masmoudi F, Abdelmalek N, Tounsi S, Dunlap CA, Trigui M. (2019) Abiotic stress resistance, plant growth promotion and antifungal potential of halotolerant bacteria from a Tunisian solar saltern. Microbiol Res. 2019 Dec; 229:126331. doi: 10.1016/j.micres.
4. Cheffi M, Bouket AC, Alenezi FN, Luptakova L, Belka M, Vallat A, Rateb ME, Tounsi S, Triki MA, Belbahri L. (2019) Olea europaea L. Root Endophyte Bacillus velezensis OEE1 Counteracts Oomycete and Fungal Harmful Pathogens and Harbours a Large Repertoire of Secreted and

Volatile Metabolites and Beneficial Functional Genes. Microorganisms. doi: 10.3390/microorganisms7090314.

5. Djebir S, Ksouri S, Trigui M, Tounsi S, Boumaaza A, Hadef Y, Benakhla A. (2019) Chemical Composition and Acaricidal Activity of the Essential Oils of Some Plant Species of Lamiaceae and Myrtaceae against the Vector of Tropical Bovine Theileriosis: Hyalomma scupense (syn. Hyalomma detritum). Biomed Res Int. doi: 10.1155/2019/7805467.
6. 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. doi: 10.1155/2018/7856517.
7. Ben Farhat-Touzri D, Jemli S, Driss F, Tounsi S. (2019) Molecular and structural characterization of a novel Cry1D toxin from Bacillus thuringiensis with high toxicity to Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae). Int J Biol Macromol. 1;126:969-976. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.175.
8. Makni S, Tounsi S, Rezgui F, Trigui M, Bouassida KZ. (2019) Emex spinosa (L.) Campd. ethyl acetate fractions effects on inflammation and oxidative stress markers in carrageenan induced paw oedema in mice. J Ethnopharmacol. 24;234:216-224. doi: 10.1016/j.jep.2018.12.015.
9. Zribi Zghal R, Frikha F, Elleuch J, Darriet F, Chandre F, Jaoua S, Tounsi S (2019) The combinatory effect of Cyt1Aa flexibility and specificity against dipteran larvae improves the toxicity of Bacillus thuringensis kurstaki toxins. Int J Biol Macromol. 123:42-49. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.226.

FORMATION DIPLOMANTE

Habilitations

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 d 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

Organisation dans le cadre du projet BIOSMAN de : Table ronde «Laser speckle imaging: Principles & Applications» le 2 Juillet 2019 à Sfax (CBS), Tunisie

PROJETS DE COOPERATION INTERNATIONALE

Projet 1- **ARIMnet 2 :**STomP: Sustainable Tomato Production: plant defence enhancement, development of new biopesticides and optimization of environmental, water and chemical inputs (**2016 – 2019**)", **(En collaboration avec Pr Noureddine Allouche-FSS).**

Projet 2- H2020-RISE: PM-4-Citrus: Citrus disease Integrated Pest Management: from Research to Market (**2017-2020**),

Projet 3- ERANETMED:**BIOSMAN**: Towards real-time monitoring of *Bacillus thuringiensis* biopesticides production using laser Speckle imaging within a Mediterranean area network (**2017-2020**),

Projet 4- H2020-COST: Huplant Control: Control of human pathogenic micro-organisms in plant systems **(2017-2021),**

Projet 5- TUN-INDIA Cooperation : 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),**

Projet 6: Projet IFS (2017-2019): Development of biocontrol agents against bacterial phytopathogens *Agrobacterium tumefaciens* and *Erwinia amylovora* based on lipopepetides and/or polyketides.

PROJETS COLLABORATIFS NATIONAUX

1/ 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 (2017-2019). En collaboration avec Pr Monem Kallel

2/ 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 (2017-2019). En collaboration avec Pr Ahmed Mliki

LR15CBS04 : Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des plantes (LBAP)

مخبـر البيوتكنولوجيا وتحسين النباتات

Responsable : Pr. Faiçal BRINI

Email : faical.brini@cbs.rnrt.tn

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	Marwa Harbaoui	En Thèse
Mohamed Nejib Saidi	Maitre Assistant	Hassiba Bouazzi	En Thèse
Rania Ben Saad	Maitre Assistant	Dhawiya Merghebi	En Thèse
Ikram Zaidi	Maitre Assistant	Hajer Ziadi	En Thèse
Anis Ben Hssouna	Maitre Assistant	Sawssen Harzalli	En Thèse
Sana Tounsi	Post -doc	Marwa Guiza	En Thèse
Karama Hamdi	Post -doc	Marwa Bouhlel	En Thèse
Rania Jmal	Post -doc	Khawla Missaoui	En Thèse
Nabil Zouari	Post -doc	Hanen Kamoun	En Thèse
Malika Ayadi	Ingénieur Principal	Ikram Zribi	En Mastère
Chedya Boughanmi	Technicien	Bouthaina BelHaj	En Mastère
Sarra Namani	Secrétaire	Amal ElBitaoui	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 chez blé dur et l'orge

L'année 2019 a marqué la fin du contrat programme 2015-2018, qui avait pour objectif d'améliorer la tolérance des plantes aux stress abiotiques. Notre participation consistait en l'isolement des gènes codants des facteurs de transcription de type ERF (Ethylene-Response Factors) chez des céréales telles que le blé dur et l'orge. Nous avons réussi à isoler deux gènes appartenant à cette grande famille chez les plantes que nous avons nommés : *TdSHN1* et *HvSHN1* à partir de blé dur et d'orge, respectivement. Nous avons caractérisé leur profil d'expression suite à l'imposition de divers types de stress abiotiques tels que : le stress salin, hydrique, froid, chaleur et hormonal. En plus, une caractérisation fonctionnelle de ces gènes, pour déterminer leur implication dans la tolérance aux stress abiotiques, a été effectuée, dans un premier temps chez la levure puis dans le tabac transgénique.

Nous avons compilé la suite des résultats obtenus pour les deux gènes *TdSHN1* et *HvSHN1* et qui concerne (i) l'effet d'éléments régulateurs (promoteur et intron) de *TdSHN1* sur son niveau d'expression chez les plantes transgéniques et sa capacité à améliorer la tolérance aux stress abiotiques (ii) l'effet de la surexpression du gène *HvSHN1* de l'orge sur la tolérance des plantes de tabac aux divers stress abiotiques par des analyses physiologiques, anatomiques et moléculaires des lignées transgéniques. Les résultats obtenus ont démontré que les éléments régulateurs revêtent une importance capitale dans l'obtention d'une tolérance exceptionnelle aux stress abiotiques chez des lignées transgéniques. Cette tolérance est significativement plus importante que celle des lignées transgéniques exprimant le cDNA seul, dépourvu de son intron et mis sous le contrôle d'un promoteur hétérologue, le 35S, réputé fort et constitutif. Nous avons poursuivis aussi des travaux afin d'étudier le rôle du facteur de transcription *TdSHN1* dans la tolérance aux stress métalliques en utilisant des plantes transgénique de tabac surexprimant *TdSHN1*. Concernant le facteur de transcription *HvSHN1*, les résultats obtenus montrent qu'à l'instar de son homologue *TdSHN1*, il est capable de conférer la tolérance aux stress abiotiques.

En effet, une réduction significative de la densité stomatique a été observé ce qui démontre son utilité surtout pour la tolérance au stress hydrique car il permet une meilleure efficience dans l'utilisation de l'eau. Malheureusement, les plantes de tabac transgéniques surexprimant *HvSHN1* sont de la génération T1, ce qui limite les chances de publication de ses résultats car la majorité des bonnes revues exigent des données provenant de la génération T3 homozygote. Des travaux supplémentaires seront donc nécessaires. Parallèlement, nous avons finalisé des travaux antérieurs qui avaient pour objectif l'évaluation de l'effet de la surexpression des gènes codants des transporteurs vacuolaires sur la tolérance et l'accumulation du cuivre, considéré comme élément polluant lorsque utilisé d'une manière excessive, chez des lignées de tabac transgéniques.

2. Les Facteurs de transcription NAC chez le blé dur

L'objectif principal de cette action de recherche consiste à identifier les membres de la famille de facteurs de transcription de type NAC chez le blé dur à partir des bases de données transcriptomiques disponibles publiquement. Ensuite, de sélectionner des gènes candidats (GC) impliqués dans la réponse aux stress biotique et/ou abiotique. Cette sélection est basée sur des analyses phylogénétiques et des études de leurs profils d'expression *in silico*. Puis, une analyse d'expression par RT-PCR quantitative de ces gènes candidats lors des stress salin et hydrique, est envisagée pour confirmer leur rôle dans la réponse à ses stress chez un génotype tolérant de blé dur (*cv*. Om Rabiaa). Dans une première partie de ce projet, des données issues de séquençage de transcriptome de blé ont été utilisées pour identifier les gènes codant pour des protéines NAC. En

effet, durant cette partie, on a récupéré des séquences protéiques de facteur de transcription NAC d'autres plantes à partir de la base de donnés Genbank. Par la suite, ces séquences ont été utilisées pour identifier ceux du blé tendre.

Ainsi, 165 séquences non redondantes avec un domaine NAC complet ont été identifiées. Ces gènes ont été soumis à des analyses phylogénétiques dans le but de comparer les séquences de blé dur avec ceux d'autres plantes monocotylédones (riz et orge) et dicotylédones (Arabette et vigne). La localisation chromosomique de ces gènes a été ensuite déterminée en utilisant les séquences du génome de blé tendre comme référence. Cette dernière analyse a permis de déterminer la localisation de ces gènes sur les chromosomes et d'identifier les gènes provenant d'évènements de duplication de régions chromosomiques. L'étude d'expression *in silico* des gènes NAC a pour but de faciliter le choix des gènes candidats pour la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Deux gènes candidats ont été sélectionnés pour des études fonctionnelles, il s'agit de deux gènes homologues nommé TtNAC2A et TtNAC2B impliqués dans la réponse aux stress abiotiques.

Dans ce contexte, on a cloné le TtNAC2A et le TtNAC2B à partir du blé dur. Les résultats de l'analyse des séquences d'acides aminés déduites ont révélé que les deux gènes partageaient 98% d'identité alors que les séquences les plus divergentes étaient observées dans les régions 3'UTR. De plus, ces deux NAC hébergent une structure intro-exon conservée parmi d'autres céréales. D'autre part, l'analyse comparative des promoteurs in *silico* a révélé la présence de nombreux éléments régulateurs cis associés au stress impliqués dans la réponse à divers stress biotiques et abiotiques (sécheresse, salinité et froid) ainsi que la réponse hormonale (ABA, MeJA, Auxine). Les régions promotrices de ces gènes ont été isolées et clonées en amont d'un gène rapporteur GUS. La génération de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant le gène GUS sous contrôle de deux promoteurs est en cours. Dans un autre volet, on s'est intéressé à comparer le niveau d'expression de TtNAC2A et son homologue sur le génome B chez deux variétés du blé dur Om Rabiaa et Mahmoudi qui présentent une différence de tolérance au stress salin et hydrique par RT-qPCR. Ces analyses ont été menées sur les feuilles et les racines de 2 variétés soumises à divers types de stress (stress salin, hydrique et traitement par l'ABA). L'analyse de l'expression a montré que les deux gènes étaient exprimés différemment dans des conditions de stress chez les deux génotypes. Les rapports d'expression relatifs les plus élevés ont été enregistrés dans le génotype tolérant au stress (Om Rabiaa) comparé au génotype sensible (Mahmoudi).

En effet, l'induction de deux gènes dans la réponse aux stress abiotiques s'effectue de manière indépendante de l'ABA. Pour caractériser d'avantage les NACs : TtNAC2A et TtNAC2B, les gènes entiers, les régions N-terminales (domaine NAC) et les régions C-terminales ont été amplifiés et intégrés dans le vecteur pGBKT7 pour déterminer la région responsable de l'activation ou la répression de la transcription. Les tests de trans-activation ont révélé que les deux gènes sont des activateurs de la transcription et que leurs régions C-terminales étaient responsables de l'activation de la transcription.

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

Dans le but d'une meilleure définition des processus de tolérance de *L. maritima* au stress salin, nous avons étudié l'effet du NaCl sur différents paramètres physiologiques. Nos résultats ont montré qu'au stade végétatif, *L. maritima* présentait un comportement typique d'une halophyte qui tolère la présence d'une concentration modérée du sel (50-200 mM NaCl) pour exprimer ses potentialités de croissance maximale. Par conséquent, il semble que *L. maritima* ne soit pas une halophyte nécessitant du sel puisque son activité de croissance n'était pas améliorée par l'augmentation du sel (au-delà de 200 mM NaCl). Ceci suggère que *L. maritima* devrait être considéré comme une halophyte facultative avec une diminution de la croissance en réponse à l'augmentation de NaCl dans

le milieu. L'apport exogène de composés chimiques a montré des effets variables sur l'efficacité de la germination des graines de *L. maritima*.

Le nitrate de potassium et les gibbérellines telles que le GA_3 ont été efficaces pour stimuler la germination. En revanche, la thio-urée et l'acide ascorbique n'ont pas amélioré de manière significative le taux de germination des graines de *L. maritima*. En effet, ces deux molécules n'agissent pas toujours comme des composés de levée de la dormance. Le GA_3 est bien connu pour augmenter et synchroniser la germination des graines de nombreuses espèces végétales, malgré son coût élevé qui limite son utilisation dans l'agriculture. Mais lors de nos traitements par 100 µM GA3, cela n'a pas eu d'effet significatif sur la germination des graines de *L. maritima* par rapport au contrôle. Au stade végétatif, une diminution du poids sec et du nombre de feuilles a été observée à 300 mM de NaCl, ce qui indique que *L. maritima* est modérément tolérante au NaCl. La culture en présence de NaCl a entraîné une forte accumulation de Na^+ dans les tissus foliaires, sans modification de la teneur en eau des feuilles. Ainsi, *L. maritima* semble pouvoir séquestrer le sel dans les cellules foliaires pour assurer l'ajustement osmotique. Cette étude physiologique a montré que *L. maritima* a un comportement halophytique typique avec une stimulation de croissance en présence du sel, augmentation de l'accumulation de Na^+ dans les feuilles et avec la stimulation de la teneur en eau.

Ces résultats suggèrent que l'halophyte *L. maritima* dispose d'un système efficace pour la séquestration de Na^+ dans les parties aériennes notamment dans les vacuoles qui dépend principalement de l'activité de la pompe H^+-ATPase vacuolaire afin de faciliter l'activité de l'antiport vacuolaire Na^+/H^+ pour stocker l'excès de sodium et s'adapter au stress salin. Nos résultats sur l'effet du stress oxydatif ont montré une augmentation de l'accumulation de l'O_2^- et du H_2O_2 dans les feuilles de *L. maritima* dans les premières 24 h du traitement. Après 48 h et 72 h de traitement, l'accumulation de l'O_2^- et du H_2O_2 dans les feuilles de *L. maritima* était encore plus élevée et s'est maintenue jusqu'à la fin du traitement aussi bien qu'a faible et qu'à forte concentration en sel. Ces observations ont été confirmées par la mesure quantitative directe de la concentration en H_2O_2. Les niveaux de la teneur en MDA ont augmenté de manière significative en fonction du temps et ils sont restés élevés par rapport aux concentrations de MDA contrôle jusqu'à la fin de l'expérience. La proline et les sucres solubles totaux agissent comme des osmolytes qui protègent la plante contre les effets toxiques des ions en sel.

Nos résultats ont montré que la teneur en proline et en sucres totaux a augmenté avec la concentration en sel. La faible teneur en RWC et la teneur élevée en proline peuvent constituer l'une des stratégies économiques de *L. maritima* pour faire face aux dommages induits par le stress salin avec un apport énergétique minimal. L'activité de superoxyde dismutase (SOD) était significativement plus élevée que celle de la CAT et de la POD dans les conditions de stress salin par rapport aux plantes contrôle. En présence du sel, l'activité de la SOD a augmenté au bout de 24 h et a diminué après 48 et 72 h par rapport à leur contrôle, respectivement. L'activité de la catalase (CAT) a montré une augmentation significative au bout de 24h à 200 et 400 mM de NaCl. Ces analyses physiologiques ont été appuyées par une approche moléculaire basée sur l'étude du niveau d'expression par RT-qPCR des gènes reliés aux stress déjà identifiés (les transporteurs d'ions *NHX1*, *VHA* et *SOS1*) chez *L. maritima.* Nos résultats ont montré que l'expression des gènes *NHX1* et *SOS1* a été induite par la salinité. Au niveau des feuilles, l'expression du gène *NHX1* a été surexprimé progressivement au fil du temps sous les deux traitements au sel ; en revanche, dans les racines, l'induction de l'expression du gène *NHX1* n'a été observée qu'à 72 h de traitement. Le gène *SOS1* a montré une expression plus élevée et plus précoce dans les feuilles que dans les racines. L'expression du gène *VHA-E1* dans les feuilles n'a été observée que sous un traitement avec 400 mM de NaCl.

<u>Projet 2 :</u> 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

Cette action a été clôturée suite au départ du Pr. Moez Hanin (qui dirigeait cette action) du Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes.

2. Etude des protéines intrinsèquement désordonnées chez les céréales

Au cours de ces 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 l'étude du désordre chez les facteurs de transcription WRKY. Les WRKYs sont impliqués dans plusieurs processus biologiques notamment dans les réponses aux stress biotique et biotiques. Les WRKYs exercent plusieurs fonctions via leurs interactions avec d'autres protéines de signalisation.

Pour mieux comprendre les rôles potentiels du désordre dans les fonctions des WRKYs, nous avons étudié le désordre des WRKYs chez *O. sativa, S.bicolor, Z. mays, T. aestivum, H. vulgare et A. thaliana* ainsi que les interactions protéine-protéine (**Fig. 1**).

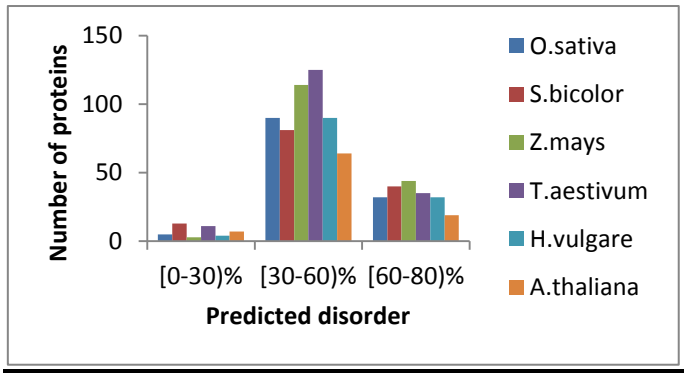


Fig. 1 Fraction de protéines avec différent degré de ''predicted disorder'' chez *O. sativa, S. bicolor, Z. mays, T. aestivum, H. vulgare et A. thaliana*.

Les analyses montrent que la distribution du désordre entre les espèces étudiées est similaire. De plus, ces caractéristiques sont conservées au cours de l'évolution ce qui indique que le désordre pourrait être crucial pour les activités biologiques des WRKYs. La multifonctionnalité des WRKYs suggère que ces protéines utilisent le désordre pour effectuer ses diverses fonctions**.**

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)

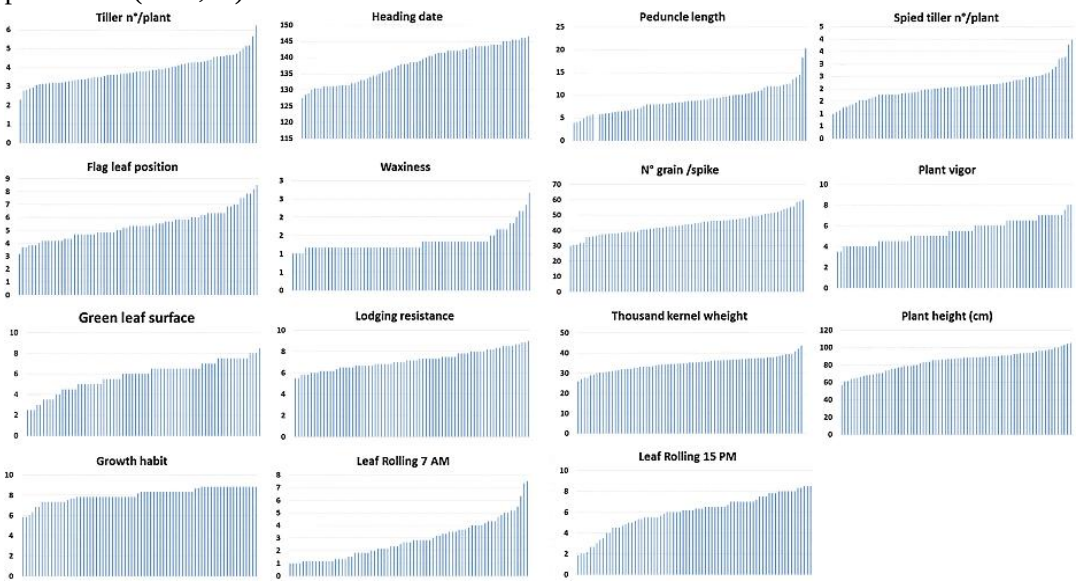
Les objectifs généraux de ce projet étaient d'étudier la variabilité génétique et les corrélations entre les traits morpho-agronomique, adaptatifs, associés au rendement et ceci à travers la collection du blé dur du CBS « CBS durum wheat collection ». Cette collection est formée de soixante-quatorze génotypes de blé dur, des landraces, des variétés anciennes et des variétés améliorées. Plusieurs traits morphologiques et agronomiques, tels que le nombre de thalles herbacées par plante (**TN / P**), nombre de talles épiés par plante (**ST / P**), précocité (**HD**), la vigueur de la plante au stade de tallage (**V**), posture de la plante au stade de cinq feuilles (**GH**), et certains caractères physiologiques des feuilles, tels que l'entité de surface foliaire verte (LGS), la position de la feuille drapeau (**FLP**), le roulement des feuilles (**LR**), le caractère cireux (**W**).

Tous ces traits ont été évalués sur deux saisons agricoles successives et ceci dans des conditions semi-arides (la station expérimentale du Kef). Cette étude a permis aussi de montrer l'impact des différents programmes d'amélioration du blé, des programmes internationaux et aussi nationaux sur la céréaliculture en Tunisie. Cette étude permettra ultérieurement l'évaluation de la potentielle utilisation des variétés locales pour les futurs programmes d'amélioration variétale. Ce travail a été effectué dans la station de recherche de l'École supérieure d'enseignement agricole du Kef située dans une zone semi-aride. Pour chaque trait étudié (adaptatif et composante du rendement), des statistiques descriptives incluant les valeurs moyennes et leurs erreurs standards ont été effectués. Les valeurs moyennes de chaque trait évalué pour tous les génotypes étudiés sont rapportées dans les graphiques et ceci par ordre croissant dans (**Fig. 2**).

Les caractères morpho-physiologiques, associés à l'adaptation et aussi au rendement, présentaient une large gamme de variabilité. En effet un large éventail a été noté entre les valeurs moyennes maximales et minimales pour les différents génotypes étudiés. Par exemple, nombre de talles par épi et le nombre de thalle épiés, qui sont une indication de la capacité de la culture à maximiser son rendement, variaient respectivement de 2,31 à 6,24 et de 0,99 à 3,98. La précocité a également montré une variabilité allant de 127 à 146 jours.

Une grande variabilité a également été observée pour l'entité de surface foliaire verte et la vigueur des plantes, allant de 2,50 à 8,50 et de 3,50 à 8,00 respectivement. La position de la feuille drapeau, associé au mécanisme d'évitement de la sécheresse, a montré une grande variabilité, de 3,17 à 8,50.

Les deux composantes du rendement, le poids de mille grains et le nombre de grains par épi, ont également montré une grande variabilité, allant de 25,75 à 45,70 g et de 29,70 à 59,77 respectivement. Une analyse des corrélations entre tous les caractères testés dans des conditions semi-arides a été effectuée. Le rendement est la résultante de plusieurs des traits contrôlés par plusieurs gènes. Ces interactions ont été fortement affectées par le génotype et aussi par les conditions environnementales, et leur complexité augmente particulièrement dans des conditions de stress. L'analyse des études de corrélation a montré des corrélations significatives entre les composantes de rendement et presque tous les traits étudiés. Le nombre de grains par épi a montré une corrélation négative significative avec la précocité (r = - 0,31). Une corrélation significative et négative a également été notée entre TKW et les traits adaptatifs les plus importants, la précocité (r = - 0,41) et la position de la feuille du drapeau (r = - 0,64). En revanche, des corrélations positives significatives ont été notées entre TKW et les deux caractères morpho métriques, la hauteur (r = 0,43) et la longueur du pédoncule (r = 0,29).



. **Fig. 2.** Distribution de fréquence des caractères étudiés par ordre croissant

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

1. Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant Protein) : <u>Exemple 1 :</u> La famille ASR (Abscisic acid, Stress and Ripening)

Les protéines LEA sont considérées parmi les protéines impliquées et associées à la tolérance aux contraintes biotiques et abiotiques que subissent les plantes. Les ASR (**A**bscisic acid, **S**tress and **R**epening) est une famille de gènes, associée à la tolérance au déficit hydrique, à la salinité et aussi impliquée dans l'adaptation des plantes aux climats arides. Les protéines correspondantes à cette famille de gènes, ont été classées comme un nouveau group (septième group) de la supère famille des LEA protéines. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons, en premier temps, isolé les ADNc de l'homologue de l'ASR chez l'orge (HvASR1) et le blé dur (TtASR1). Vue la relation étroite entre la structure et la fonction, et aussi pour mieux comprendre la multifonctionnalité des protéines ASR, une étude structurale des protéines HvASR1 et TtASR1, a été menée en collaboration avec le laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules biologiques (Université Aix-Marseille, CNRS UMR7257).

Dans cette étude et grâce au programme de prédiction le méta server MeDor, les deux protéines HvASR1 et TtASR1 sont prédites être désordonnées. Ensuite sur la base des outils biophysiques, il a été démontré que les deux protéines HvASR1 et TtASR1 sont des protéines désordonnées dépourvues d'une structure secondaire et tertiaire stable, ils sont hypersensibles à la protéolyse limitée et ils possèdent des paramètres hydrodynamiques et des profils de diffusion SAXS (Small Angle X-ray Scattering) des protéines intrinsèquement désordonnées. En outre, la distribution de rayon de giration (Rg) des sous-ensembles sélectionnés de HvASR1 et TtASR1 suggère l'existence de deux populations différentes caractérisées par une taille moyenne différente. Ces données peuvent expliquer leurs flexibilités et leurs plurifonctionnalités. En effet, au cours de ce travail, nous avons remarqué que TtASR1 fait partie du groupe des PID (Protein Intrinsically Disordered) possédant des structures secondaires résiduelles (PMG Pre-Molten Globule) alors que HvASR1 a été caractérisée comme presque entièrement désordonnées. Cette différence structurale entre les deux protéines pourrait expliquer la différence fonctionnelle observée.

Il a été aussi démontré que la chaleur induit une transition structurale et un repliement des deux protéines HvASR1 et TtASR1. Et qui pourrait être derrière l'effet chaperonne et la tolérance des souches bactériennes exprimant ces protéines à 50°C. Les analyses par CD, en présence de glycérol, ont montré que la dessiccation déclenche un gain en structure secondaire de HvASR1 et TtASR1. L'addition d'ions Zn^{2+} déclenche un changement de conformation de HvASR1 et TtASR1.

<u>Exemple 2 :</u> La famille LEA_5 (Late Embryogenesis Abundant Protein groupe 1)

Dans ce cadre, trois membres appartenant au groupe 1 de la famille LEA ont été isolés à partir de la variété Om Rabiaa du blé dur. Deux membres s'expriment dans les embryons matures, le premier présent une taille de 342 pb code pour une protéine de 113 aa, une masse moléculaire de 12 kDa. Le deuxième membre a une taille de 297 pb code pour une protéine de 98 aa, une masse moléculaire de 10 kDa. Le troisième membre est exprimé après traitement des embryons par le mannitol pendant 24 h. Il possède un ORF de 402 pb, code pour une protéine de 133 aa, une masse moléculaire de 14 kDa.

La séquence protéique de ces trois gènes isolés possède le segment caractéristique commun aux LEA5 des plantes, un segment de 20 acides aminés (TRKEQ [L/M] G[T/E] EGY [Q/K] EMGRKGG [L/E]. Le nombre de ce segment diffère d'un membre à l'autre. Le premier membre contient 2 segments qui se répètent en tandem alors que le deuxième possède un seul dans la partie C-terminale de la protéine, alors que le troisième membre contient trois segments. A coté de cette séquence conservée, ces protéines contiennent un autre motif conservé (TVVPGGTGGKSLEAQE [H/N] LAE) en N-terminale juste avant le segment de ces 20 aa et un motif dans la partie C-terminale

(D [K/E]SGGERA[A/E] [E/R] EGI[E/D] IDESK [F/Y]). L'analyse de la séquence protéique par le programme PONDR (www.pondr.com) dont l'objectif est de prédire *in silico* les contributions de domaines désordonnés à partir de la séquence primaire d'acides aminés de la protéine a montré qu'une grande partie (presque 90%) de ces trois protéines est non structurée. Les gènes isolés ont été clonés dans les vecteurs d'expression (Pet 28a (+), pGEX-4T-1).

Les protéines produites ont été purifiées pour l'étude de leur implication dans l'amélioration de l'activité et la thermostabilité de la LDH (lactate déshydrogénase) et le citrate synthase (CS), deux enzymes modèles sensibles au traitement par la chaleur et le froid. Dans ce cadre, l'effet de la protéine complète purifiée sur l'activité de l'enzyme LDH a été testé sous l'effet d'un stress thermique (55°C). L'eau et le tampon phosphate (10 mM) ont été utilisés comme contrôle négatif. La BSA a été utilisée comme contrôle positif. Cette dernière est connue pour son rôle en tant qu'agent stabilisateur et protecteur de l'activité de plusieurs enzymes. Sans stress, l'activité de l'enzyme est de 100% en présence de différents composants. Lorsque l'enzyme est incubé à 55°C, en présence d'eau et du tampon son activité diminue très rapidement. En revanche, en présence des protéines LEA, son activité est supérieure à celle observée avec la BSA. Ces résultats préliminaires montrent que ces protéines sont capables de protéger la LDH et préserver son activité enzymatique lors d'un stress par la chaleur d'une manière plus efficace.

Ceci nous amène à tester d'autre types de stress comme le froid, le stress oxydatif, la déshydratation et d'examiner avec profondeur le rôle ce ces protéine *in vitro* en investiguant leur effet sur l'agrégation de ces enzymes modèles ou des protéines extraites du blé. En outre, les cDNA de ces trois gènes ont été clonés dans le vecteur pYES2 en aval du promoteur inductible par le galactose. Les constructions obtenues ont été transférées à la souche sauvage de *S. cerevisiae*. Par la suite, ces clones recombinants ont été utilisés pour des tests de croissance en milieu solide en présence du sorbitol (1M), LiCl (40 mM), NaCl (1M). Un traitement par la chaleur et par le froid a été aussi effectué. Les résultats montrent que dans les conditions standard, il n'ya pas une différence entre les cellules de levures exprimant le vecteur vide et les cellules qui portent les protéines LEA5. En conditions de stress la surexpression de la protéine LEA5 confère une tolérance à ces contraintes qui se manifestent par une croissance plus prononcée pour les cellules sur-exprimant ces protéines par rapport aux cellules qui portent le vecteur vide. Ceci suggère l'effet protecteur de la protéine LEA5 de blé dur *in vivo* suite aux contraintes environnementales exercées.

2. Etude du rôle de la CAT et la SOD de *Triticum monococcum* en réponse aux stresses abiotiques et biotiques

Les végétaux sont soumis à un grand nombre de contraintes environnementales de nature biotique et abiotique qui sont capables d'induire l'accumulation de ROS tels que l'anion superoxyde ($O2^{\bullet-}$), ou le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet ($^1O_2$). Pour maintenir l'homéostasie cellulaire, le taux des ROS est contrôlé par des molécules antioxydantes qui agissent à faibles concentrations. Parmi les antioxydants qui défendent les cellules contre les radicaux libres, nous trouvons la SOD et la CAT. La SOD est la première enzyme antioxydante impliquée dans la défense contre le stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation de l'$O_2^{.-}$ en H_2O_2 et O_2. Le H_2O_2 produit par les SOD doit être rapidement métabolisé par la CAT pour que la protection apportée par les SOD soit effective, sinon, l'accumulation de H_2O_2 devient nocive. Ainsi, la CAT transforme le H_2O_2 en H_2O et O_2. Dans ce travail, nous avons isolé la superoxide dismutase (SOD) et la catalase (CAT) à partir du *T. monococcum*. Nous avons étudié leur profil d'expression en réponse aux différents stress par real-time RT-PCR. Nos résultats ont bien montré que ces deux gènes sont fortement exprimés en réponse au stress salin (NaCl), stress oxydatif (H_2O_2), stress hormonaux (ABA, AS) et aux métaux lourds ($CdCl_2$). Nous avons également étudié les propriétés fonctionnelles

de ces deux gènes *TmMnSOD* et *TmCAT1* chez *S. cerevisiae*. Nous avons montré que ces deux gènes apportent une meilleure tolérance aux stress abiotiques chez la levure (**Fig. 3**).

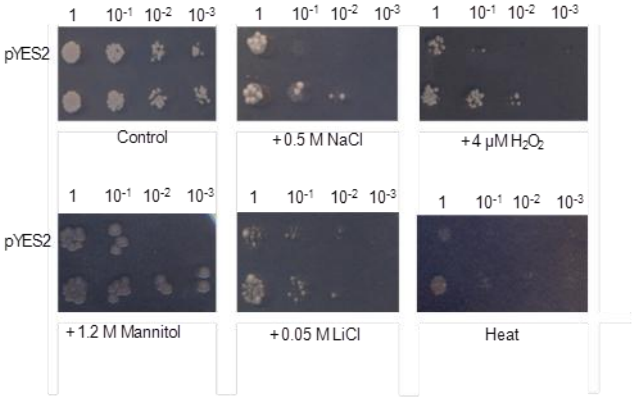


Fig. 3 : Expression hétérologue de *TmMnSOD* chez les cellules de levures

Afin de pouvoir analyser la localisation tissulaire de l'expression des deux gènes, nous avons identifié les deux régions promotrices de *TmMnSOD et TmCAT1*. L'analyse bioinformatique de ces deux séquences a permis de mettre en évidence plusieurs éléments cis-régulateurs potentiels impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (salinité et chaleur) et aux stress biotiques et hormonaux.

4. Compréhension des processus de l'acquisition de la tolérance à la salinité chez des plantes via des investigations métaboliques et enzymatiques : Cas de *l'Agave americana*

Les plantes représentent une source très importante de métabolites qui a commencé à prendre son essor au cours de ces dernières décennies dans les domaines de valorisation des richesses métaboliques pour le bien de l'Humanité. C'est dans ce cadre que nous nous sommes proposé de profiter de la potentialité d'une plante très bien représentée dans la médecine traditionnelle et dans des objectifs biotechnologiques, l'*Agave americana*.

Nous avons déterminé dans un premier temps, la composition en métabolites et composés utilisables et valorisables selon les besoins. En effet, le jus d'*Agave americana* renferme des tannins, des saponins, des phlobatanins, des glycosides, des terpenoides, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des anthraquinones, des carbohydrates, de la vitamine C…etc. Concernant les carbohydrates, nous avons injecté l'extrait aqueux de la plante matrice dans une colonne de polysaccharides couplée à un système HPLC qui nous a permis de décortiquer la composition. Dans le même cadre, nous avons déterminé la quantité de la vitamine C existant dans l'extrait de la plante matrice.

En effet, nous avons injecté le jus d'*Agave americana* contre un standard de la vitamine C sur une colonne d'affinité couplée à un système HPLC. Les profiles chromatographiques obtenus illustrent d'une manière claire et nette la présence d'une fraction importante de cette vitamine dans le jus préparé. Ceci plaide en faveur de la plausibilité de la purification de cette vitamine, à partir de l'extrait d'*Agave americana*, envie de leur utilisation potentielle dans l'industrie agroalimentaire.

Dans l'objectif de mieux caractériser cette plante nous nous sommes proposés dans un deuxième temps de faire un balayage des enzymes dont le dosage de leur activité est disponible.

En effet, nous remarquons une importante présence des deux classes (la classe des hydrolases et celle des oxidoreductases) à travers l'activité protéase, l'activité α-amylase et l'activité β-glucosidase d'une part et l'activité tyrosinase et l'activité peroxidase d'autre part. Pour se faire, nous avons entamé une étude biochimique complète de l'activité α-amylase et de l'activité protéase à partir du jus de feuilles de l'*Agave americana*.

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.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Liste des publications internationales parues en 2019:

1/ Boukid F, Dall'Asta M, Bresciani L, Mena P, Del Rio D, Calani L, Sayar R, Seo YW, Yacoubi I, Mejri M (**2019**) Phenolic profile and antioxidant capacity of landraces, old and modern Tunisian durum wheat. *European Food Research and Technology* 245(1): 73-82.

2/ Safi H, Belgaroui N, Masmoudi K. Brini F (**2019**) Promoter of the wheat lipid transfer protein, TdLTP4, drives leaf-preferential expression in transgenic Arabidopsis plants. *Functional Plant Biology* 46(3): 275-285.

3/ Ben Hsouna A, Gargouri M, Dhifi W, Ben Saad R, Sayahi N, Mnif W, Saibi W (**2019**) Potential anti-inflammatory and antioxidant effects of *Citrus aurantium* essential oil against carbon tetrachloride-mediated hepatotoxicity: A biochemical, molecular and histopathological changes in adult rats. *Environmental Toxicology* 34(4): 388-400.

4/ Safi H, Wangorsch A, Lidholm J, Brini F, Spiric J, Rihs H P, Vieths S, Armentia A, Farioli L et Diaz-Perales A (**2019**) Identification and molecular characterization of allergenic non-specific lipid-transfer protein from durum wheat (*Triticum turgidum* D.). *Clinical & Experimental Allergy* 49(1): 120-129.

5/ Ben Hsouna A, Ben Saad R, Zouari N, Ben Romdhane W, Brini F, Ben Salah R (**2019**) Stress associated protein from *Lobularia maritima*: Heterologous expression, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in beef meat. *International Journal of Biological Macromolecules* 132: 888-896.

6/ Ghorbel M, Zaidi I, Ebel Ch, Hanin M **(2019)** Differential regulation of the durum wheat MAPK phosphatase 1 by calmodulin, bivalent cations and possibly mitogen activated protein kinase 3. *Plant Physiology and Biochemistry* 135: 242-252.

7/ Djemel R, Khoudi H **(2019)** Combination of the endogenous promoter-intron significantly improves salt and drought tolerance conferred by TdSHN1 transcription factor in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* 139: 435-445.

8/ Choura M, Rebai A **(2019)** The disordered charged biased proteins in the human diseasome**.** *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences,* doi.org/10.1007/s12539-019-00315-0

9/ Tounsi S, Kamoun Y, Feki K, Jemli S, Saïdi MN, Ziadi H, Alcon C, Brini F (**2019**) Localization and expression analysis of a novel catalase from *Triticum monococcum* TmCAT1 involved in response to different environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, doi 10.1016/j.plaphy.2019.03.039.

10/ Ben Hsouna A, Dhibi S, Dhifi W, Mnif W, Ben Nasra H, Hfaiedh N **(2019)** Chemical composition and hepatoprotective effect of essential oil from Myrtus communis L. flowers against CCL4-induced acute hepatotoxicity in rats. *RSC Advances* 9: 3777-3787.

11/ Ben Hsouna A, Touj N, Hammami I, Dridi K, Al-Ayed AS, Hamdi N **(2019)** Chemical Composition and *in vivo* Efficacy of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. in the Suppression of Crown Gall Disease on Tomato Plants. *Journal of Oleo Science* doi : 10.5650/jos.ess18261

12/ Sellami S, Le Hir R, Thorpe MR, Aubry E, Wolff N, Vilaine F, Brini F, Dinant S (**2019**) Arabidopsis Natural Accessions Display Adaptations in Inflorescence Growth and Vascular Anatomy to Withstand High Salinity during Reproductive Growth. *Plants* 8(61), doi: 10.3390/plants8030061

13/ Koubaa S, Bremer A, Hincha DK, Brini F (**2019**) Structural properties and enzyme stabilization function of the intrinsically disordered LEA_4 protein TdLEA3 from wheat. *Scientific Reports* 9: 3720, https://doi.org/10.1038/s41598-019-39823-w.

14/ Bouazzi H, Feki K, Brini F, Saibi W (**2019**) Is duality between proline metabolic mutation (p5cs 1-4) and durum wheat dehydrin transgenic contexts a "pacemaker" for salt tolerance process in *Arabidopsis thaliana*? *Acta Physiologia Plantarum* 41(3):36, doi.org/10.1007/s11738-019-2829-6.

15/ Ben Saad R, Safi H, Ben Hsouna A, Brini F, Ben Romdhane W (**2019**) Functional domain analysis of LmSAP protein reveals the crucial role of the zinc-finger A20 domain in abiotic stress tolerance. *Protoplasma* doi.org/10.1007/s00709-019-01390-2

16/ Ayadi M, Brini F, Masmoudi K **(2019)** Overexpression of a Wheat Aquaporin Gene, TdPIP2;1, Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Durum Wheat cv. Maali. *International Journal of Molecular Sciences* 20(10): 2389, http://dx.doi.org/10.3390/ijms20102389

17/ Ben Saad R, Harbaoui M, Ben Romdhane W, Zouari N, Khong NG, Ben Hssouna A, Brini F **(2019)** Overexpression of *Triticum durum* TdAnn12 gene confers stress tolerance through scavenging ROS in transgenic tobacco. *Functional Plant Biology* https://doi.org/10.1071/FP18316

18/ Sellami S, Le Hir R, Thorpe MR, Vilaine F, Wolff N, Brini F, Dinant D **(2019)** Salinity Effects on Sugar Homeostasis and Vascular Anatomy in the Stem of the *Arabidopsis thaliana* Inflorescence. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (13): 3167; doi: 10.3390/ijms20133167

19/ Yacoubi I, Nigro D, Sayar R, Masmoudi Kh, Seo YW, Brini F, Giove SL, Mangini G, Giancaspro A, Marcotuli I, Colasuonno P, Agata A **(2019)** New insight into the North-African durum wheat biodiversity: phenotypic variations for adaptive and agronomic traits. *Genetic Resources Crop Evolution* https://doi.org/10.1007/s10722-019-00807-4

20/ Bouazzi H, Feki K, Zouari N, Sahnoun M, Brini F, Saibi W **(2019)** Causal Enzymology and Physiological Aspects May Be Accountable to Membrane Integrity in Response to Salt Stress in *Arabidopsis thaliana* Lines. *BioMed Research International* https://doi.org/10.1155/2019/3534943

21/ Tounsi S, Feki K, Kamoun Y, Saidi MN, Jemli S, Ghorbel M, Alcon C, Brini F **(2019)** Highlight on the expression and the function of a novel MnSOD from diploid wheat (*T. monococcum*) in response to abiotic stress and heavy metal toxicity. *Plant Physiology and Biochemistry* 142: 384-394; https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.001.

22/ Ben Hsouna A, Dhibi S, Dhifi W, Ben Saad R, Brini F, Hfaidh N, Mnif W **(2019)** Essential oil from halophyte *Lobularia maritima*: protective effects against CCl4-induced hepatic oxidative damage in rats and inhibition of the production of proinflammatory gene expression by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *RSC Advances* 9: 36758; DOI: 10.1039/c9ra05885k

23/ Boubakri H, Saidi MN, Barhoumi F, Kamoun H, Jebara M, Brini F **(2019)** Identification and Characterization of Thioredoxin H-Type Gene Family in *Triticum turgidum* ssp. durum in Response to Natural and Environmental Factor-Induced Oxidative Stress. *Plant Molecular Biology Reporter* https://doi.org/10.1007/s11105-019-01176-z

24/ Ben Saad R, Ben Romdhane W, Ben Hsouna A, Mihoubi W, Harbaoui M, Brini F **(2019)** Insights into plant annexins function in abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, e1699264-2; https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1699264

25/ Gouiaa S, Khoudi H **(2019)** Expression of V-PPase proton pump, singly or in combination with a NHX1 transporter, in transgenic tobacco improves copper tolerance and accumulation. *Environmental Science and Pollution Research* 274: 137-145.

26/ Soilhi Z, Trindade H, Vicente S, Gouiaa S, Khoudi H, Mekki M **(2019)** Assessment of the genetic diversity and relationships of a collection of *Mentha* spp. In Tunisia using morphological traits and ISSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1702482.

27/ Choura M, Ebel Ch, Hanin M **(2019)** Genomic analysis of intrinsically disordered proteins in cereals: from mining to meaning. *Gene* 714: 143984.

28/ Choura M, Rebaï A, Hanin M **(2019)** Proteome-Wide analysis of protein disorder in *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *Computational Biology and Chemistry* 84: 107138.

II/ Chapitres d'ouvrage en 2019

1/ Brini F, Bouazzi H, Feki K, Saibi W (**2019**) The Proline Metabolism of Durum Wheat Dehydrin Transgenic Context and Salt Tolerance Acquisition in *Arabidopsis thaliana*: Profiling and Counter Action. Book entitled: Approaches for Enhancing Abiotic Stress Tolerance in Plants. Edited by Hasanuzzaman et al., Taylor & Francis Group, ISBN 9780815346425 - CAT# K345347, chapter 20, pp: 365-370.

2/ Tounsi S, Feki K, Brini F **(2019)** Abiotic stress signaling in wheat crop. In a book entitled: ''Wheat Production in Changing Environments'' edited by Hasanuzzaman Mirza, Nahar Kamrun and Hossain Amzad (Eds.), Springer, ISBN: 978-981-13-6883-7. Chapter 12, pp: 261-282.

FORMATION DIPLOMANTE

Thèses Soutenues en 2019

1/ Mariem Bradaii (19/02/2019 à la FSS, Directeurs de thèse : *Pr.* Moez Hanin & *Dr.* Chantal Ebel).
2/ Sahar Sellami (18/12/2019 à l'ISA-Chott Mariem, Directeur de thèse : *Pr.* Faiçal Brini).
3/ Sana Koubaa (30/12/2019 à l'ENIS, Directeur de thèse : *Pr.* Faiçal Brini).

Mastères Soutenus en 2019

1/ Ikram Zribi (26/07/2019 à la FSS, Encadreur : *Pr.* Faiçal Brini).
2/ Boutheina Bel Hadj (10/09/2019 à la FSS, Encadreur : *Dr.* Anis Ben Hssouna).
3/ Amal El Bitaoui (24/10/2019 à la FSG, Encadreur : *Dr.* Anis Ben Hssouna).

CONVENTIONS AVEC DES PARTENAIRES SCIENTIFIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES

1/ Convention 1: LBAP, CBS/ **Sapienza University of Roma-Italy**.

2/ Convention 2: LBAP, CBS/ **Selcuk University-Konya-Turkey.**

3/ Convention 3 : LBAP, CBS / L'**Industrie PHILADELPHIA PHARMA- Tunisia** dans la thématique suivante : «Exploration et valorisation des molécules bioactives d'origine végétale à haute valeur ajoutée: applications dans le domaine pharmaceutique, agroalimentaire, cosmétique et médicinal ».

SEMINAIRES, JOURNEES ET ATELIERS SCIENTIFIQUES EN 2019

-Participation à l'organisation des journées internationales MCB2 et ce du 16 au 20 Mars 2019 à Hammamet-Tunisie

PROJETS DE COOPERATION INTERNATIONALE EN COURS OU ACCEPTES EN 2019

- Projet Prima section 2 (2019-2021) (IMPRESA): IMProving **RES**ilience to **A**biotic stresses in durum wheat: enhancing knowledge by genetic, physiological and "omics" approaches and increasing Mediterranean germplasm biodiversity by crop wild relatives-based introgressiomics. (Coordinateur: Faiçal Brini)
-Projet PRIMA-2019, **Section 2 (EXPLOWHEAT):** Exploring durum wheat genotypes to minimize drought stress impact on grain yield and nutritional quality. (Coordinateur : Dr. Mohamed Nejib Saidi).
- Projet i-COOP 2019 (**ref: COOPB 20426**): Tailored Genomic Edition to Improve Rice Resilience. (Coordinateur: Faiçal Brini)
- **Projet Accord Universitaire International 2019 (University Sapienza, Rome/ CBS**: Genetic and molecular strategies to improve yield and drought tolerance in Tunisian wheat. (Coordinateur: Faiçal Brini).

PROGRAMMES NATIONAUX

Trois Projets d'Encouragement des Jeunes Chercheurs acceptés en 2019 :

- Mouna Choura : « Etude des protéines intrinsèquement désordonnées chez les céréales » Code projet : 18PJEC06-02 (2018-2019)
- **Nejib Saidi**: «Transcriptomic Analysis of Abiotic Stress Response in Wheat» Code projet: 19PEJC07-04 (2019-2020)
- **Rania Ben Saad**: « Dissection des réseaux de régulation du gène AlSRG1 isolé à partir d'Aeluropus littoralis liés aux stress abiotiques via une approche transcriptomique: RNA-seq ». (2019-2020)

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
ELHADEF Khaoula

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 2019.

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, Mme Mariam FOURATI-SAHNOUN et Melle ELHADEF Khaoula (doctorantes).

1. ***Biomolécules à partir de plantes***

1.1. *Inula graveolens*

La composition chimique et les activités biologiques des plantes aromatiques peuvent être influencées par les changements saisonniers. Dans ce cadre, nous avons étudié la composition et les activités biologiques de l'huile essentielle de la plante halophyle *Inula graveolens* (IGEO), collectée dans le marais

salant de la région de Chebba, sur quatre saisons différentes: le printemps, l'été, l'automne et l'hiver (avril, juillet, octobre et Janvier, respectivement). Par analyse GC / MS nous avons identifié 30 composés dans les quatre huiles essentielles de cette plante. Nous avons noté une variation surtout quantitative que qualitative en fonction de la saison. Nous avons révélé une présence prédominante d'acétate de bornyle et de bornéol. Les activités biologiques étaient également liées à la saison des récoltes; par conséquent, IGEO du printemps a donné les meilleurs résultats d'activité antioxydante et IGEO de l'automne semblait être le plus puissant contre les micro-organismes pathogènes, tandis que les huiles d'été et d'hiver étaient les inhibiteurs les plus puissants de l'acétylcholinestérase et de la tyrosinase.

Nous avons établi une matrice reliant les principaux composés IGEO aux activités biologiques **(Fig. 1)** et ce pour identifier les relations entre les concentrations des molécules volatiles et les activités biologiques. Les résultats obtenus ont révélé que chaque activité biologique dépend de la fluctuation saisonnière des quantités de certains composés chimiques.

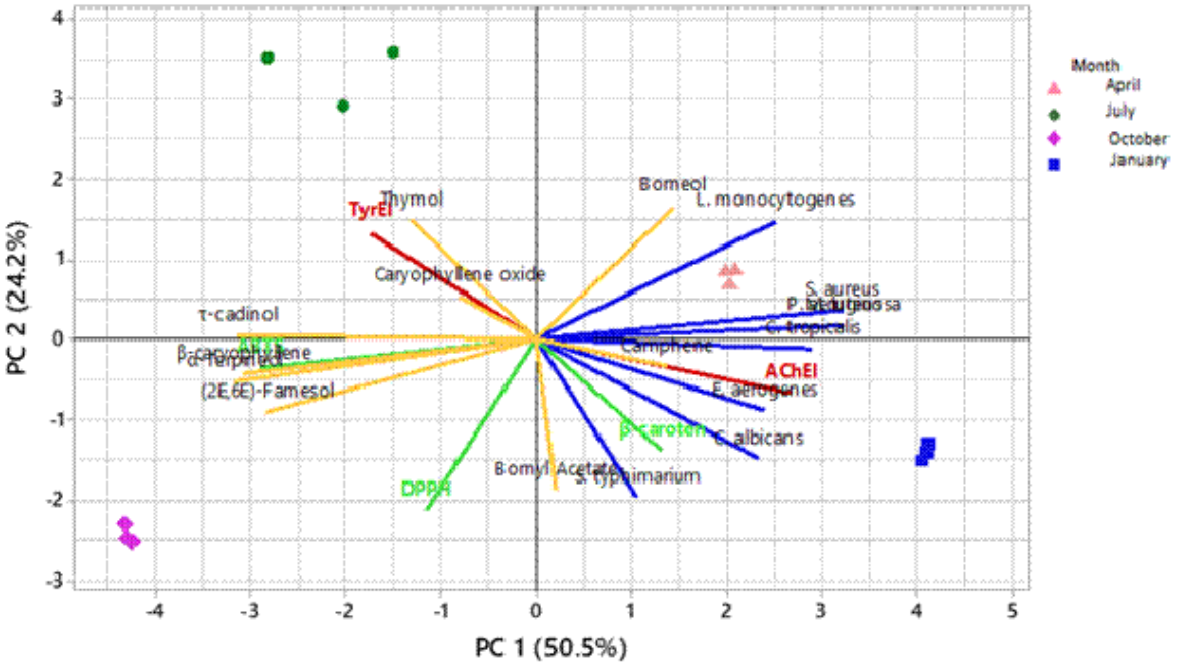


Figure 1. *Analyse en composantes principales (ACP) basée sur la matrice de corrélation des principaux composés IGEO (> 1%) et les activités biologiques suivant la période de récolte.*

1.2. *Punica granatum*

L'utilisation alimentaire des extraordinaires vertus des plantes pour alimentation humaine est très ancienne et évolue avec l'histoire. Bien qu'une grande partie du vingtième siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents actifs à partir des plantes a permis la découverte d'un grand nombre de molécules actives. Ainsi, la plupart des récentes recherches ont été orientées vers l'identification des antioxydants naturels provenant d'extraits des plantes. En Tunisie, il existe différentes variétés de plantes qui constituent des sources naturelles pouvant être exploitées, dans ce contexte, figure le grenadier (*Punica granatum*). Originaire du bassin méditerranéen, Moyen-Orient, sud de l'Asie et Amérique latine, les fruits du grenadier ainsi que ses graines, son écorce et ses fleurs sont utilisés depuis des milliers d'années pour leurs propriétés médicinales et thérapeutiques. Mes travaux de recherche s'inscrivaient dans le cadre de la valorisation d'écorce de grenade (*Punica granatum* L.) en vue de l'amélioration de la qualité de la viande hachée du boeuf. Dans une première partie, nous avons optimisé les composés phytochimiques : la teneur totale en composés phénoliques (TPC), la teneur totale en flavonoïdes (TFC) et la teneur en anthocyanes totales (TAC) et activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella enterica* des écorces de *P. granatum*. Les effets du temps d'extraction (10 à 60 min), de vitesse d'agitation (120 à 180 tr / min) et du rapport solvant / solide (10 à 30) sur le contenu phytochimique et activité antibactérienne ont été déterminés. Les méthodes de la surface de réponse (RSM) et du réseau de neurones artificiels (ANN) ont été utilisées pour l'optimisation. Par rapport aux conditions initiales, TPC, TFC et TAC ont augmenté respectivement de 56,22,

63,47 et 64,6%. D'autre part, le maximum d'activité antibactérienne était supérieur à celui obtenu dans des conditions pré-optimisées. En effet, avec un temps d'extraction de 11 min, une vitesse d'agitation de 125 tr / min et un rapport solvant/solide de 12, la concentration minimale inhibitrice (CMI) inhibitrice de *S. aureus* a diminué de manière remarquable de 1,56 à 0,171 mg / mL. Egalement, nous avons démontré que les modèles ANN étaient meilleurs que le modèle RSM pour prévoir le contenu photochimique et l'activité antibactérienne.

Dans un deuxième temps, et afin d'explorer le mode d'action d'extrait d'écorce de grenade dans des conditions optimales contre *S. aureus* et *S. enterica*, une approche statistique des modèles linéaires (ANOVA) et généraux (ANCOVA) a été utilisée. Il a été démontré que l'extrait d'écorce de grenade contrôlait les deux agents pathogènes d'origine alimentaire en supprimant la croissance bactérienne.

2. *Biomolécules à partir de bactéries lactiques*

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 et sélectionnées dont la souche YB1 qui a été identifiée comme étant une nouvelle bactérie lactique du genre *Leuconostoc.* Nous avons démontré que l'activité biologique de cette souche est de nature protéique (bactériocine BacYB1). Nous avons optimisé les conditions de production de BacYB1 par la souche YB1. La caractérisation de BacYB1 (masse et séquence NH2 Ter) est en cours de réalisation.

3. *Biomolécules à partir de Streptomyces*

3.1. Troisième molécule de rhamnopyranoside à partir de la souche TN58

Nous avons extrait, purifié et caractérisé chimiquement une troisième molécule bioactive (M3) de la famille des rhamnopyranosides (Fig. 2) à partir du surnageant d'une culture de la souche de *Streptomyces* TN58. Cette molécule a été détectée par la technique DEDL (détecteur évaporatif à diffusion de lumière).

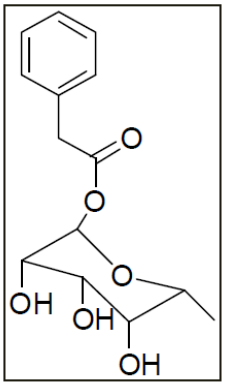


Figure 2. Structure chimique de la molécule bioactive M3 (phényle-Acétylerhamnopyranoside)

3.2. Voies de biosynthèses des biomolécules de rhamnopyranosides de la souche TN58

L'un des objectifs du projet 1 du contrat programme du LMB, est la localisation et l'analyse des gènes du ou des clusters impliqués dans la biosynthèse des molécules de la famille des rhamnopyranosides secrétées par la souche de *Streptomyces* TN58. A noter que ces biomolécules sont connues par leurs activités anticancéreuses.

Cette étude a été initiée depuis plusieurs années et durant l'année écoulée nous avons clôturé cette étude tout en émettant l'hypothèse que la biosynthèse des trois biomolécules de rhamnopyranosides secrétées par la souche de *Streptopmyces* TN58 n'est pas liée aux gènes glycosyltransférases mais plutôt, cette biosynthèse fait intervenir des aryles transférases. Ce résultat est très original et n'a jamais été décrit. Il s'agit d'aryles-transférases (benzoyles ou phényles transférases) qui seraient responsables du transfert du groupement aryle (benzoyle ou phényle) sur le rhamnose, cesenzymes auraient comme substrat le benzoyle-CoA ou phényl/ acétyl-CoA. L'activation du substrat pourrait être réalisée par une benzoyle-CoA ligase ou une phényl/acétyl-CoA ligase. Un génome mining de *Streptomyces* sp.TN58 a permis d'identifier quelques gènes candidats. Particulièrement un gène appelé *orf0054* codant une phényle-acétyle CoA ligase putative a été retenu. L'inactivation de ce gène ne permet plus à la souche de produire les trois molécules d'acyle-rhamnopyranosides.

4. *Molécules bioactives synthétiques*

Bien que notre activité de recherche est axée sur les molécules bioactives d'origines naturelles (plantes et microorganismes), nous avons établi des relations avec des collègues Saoudiens et Turques qui sont des chimistes qui s'intéressent à la synthèse chimique de nouvelles molécules qui peuvent avoir des applications industrielles. Notre participation à cette coopération a consisté à déterminer les activités biologiques des molécules synthétisées chimiquement par ces collègues chimistes. Dans ce cadre, plusieurs composés synthétiques ont été préparés et analysés pour leurs activités biologiques et certains ont été retenus pour leurs importantes activités à savoir des dérivés de carbènes hétoérocycliques, des dérivés de coumarins et des complexes de palladiums. Des publications en
Commun ont été générées et un brevet a été déposé cette année.

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)

2 Etude de la possibilité de synergisme entre les δ-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* et l'acide phytique

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

3 Etudes portant sur les enzymes β-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.

3.1. Criblage de souches de *Bacillus* productrices de β-mannanases

Suite à une procédure de 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*.
A titre d'exemple, le gène codant la β-mannanase Man US191 code pour un polypeptide de 320 aas présentant 99% d'identité (317/320) avec les β-mannanases de *Bacillus subtilis* E1 et *Bacillus pumilus* CCAM080065.**US191**

2.2. In vitro évaluation des propriétés probiotiques de la souche *Bacillus subtilis*

Une étude *in vitro* a été réalisée en vue de 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.

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).

1. **Etude de l'incorporation de la souche probiotique TN8 sur la qualité microbiologique de la viande hachée**

La souche probiotique TN8 a été inoculée dans la viande hachée comme suit : (T1 : échantillon inoculé avec 10^7 UFC/g de la souche TN8; T2: échantillon inoculé avec 10^8 UFC/g de la souche TN8 ; T3: échantillon inoculé avec 10^9 UFC/g de la souche TN8), une analyse microbiologique a été suivie durant 10 jours de stockage.

les *Enterobactériaceae* ne sont pas détectées dans tous les échantillons (valeurs inférieures à la limite de détection < 10^1 UFC/g) jusqu'au 4ème jour du stockage. Après 7 jours de stockage à 4 °C, les entérobactéries présentent une faible croissance dans les viandes hachées mais sans dépasser la limite maximale recommandée de 2 log UFC/g qui est définie par ISO 4833:2003 et ICMSF (1986). Alors qu'au 10ème jour du stockage, l'échantillon contrôle dépasse la limite recommandée. Ces résultats ont confirmé l'effet inhibiteur des cultures probiotiques inoculées sur la croissance des entérobactéries.

Cette réduction peut être due à l'acidification du milieu contre la croissance des entérobactéries, ce qui nous permet d'obtenir des produits hygiéniques de haute qualité (Coppola *et al.*, 1995; Benito *et al.*, 2007; Rubioa *et al.*, 2013).

La souche TN8 réduit aussi le nombre des bactéries psychrophiles dans la viande hachée. En effet, après 7 jours de stockage le nombre de bactéries psychrophiles est de l'ordre 4,2 ; 5 et 5,9 log UFC/g dans les échantillons T1, T2 et T3, respectivement. Alors que, dans le nombre de psychrophile dans l'échantillon contrôle est de l'ordre de 6,8 log UFC/g. L'échantillon contrôle dépasse la limite maximale et commence à se détériorer après 7 jours de stockage. Ainsi, la souche probiotique TN8 est capable d'augmenter la durée de conservation des produits de charcuterie.

En outre, les agents pathogènes d'origine alimentaire (*Listeria.* sp et *Salmonella.* sp) ne sont pas détectés dans tous les échantillons, qui confirment la sécurité de ces produits recommandés par APHA (1992).

2. **Etude de l'incorporation de la souche probiotique TN8 sur les propriétés biochimiques de la viande hachée**

La viande et ses dérivées représentent l'un des aliments les plus importants de notre alimentation équilibrée puisqu'ils ils sont des aliments nutritifs avec leurs richesses en protéines, en acides gras à chaînes longues, en oligo-éléments essentiels (cuivre, fer, iode, manganèse, sélénium, zinc), en vitamines B, et en d'autres micronutriments (De Smet et Vossen, 2016).

Les analyses biochimiques permettant d'évaluer les propriétés biochimiques de la viande sont la teneur en protéines, cendre et humidité.

Le suivi de la composition chimique de la viande en déterminant la teneur en humidité, cendre et protéines montre 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. La teneur en humidité dans les différentes formulations (72,85-73,49%) présente des quantités approximativement similaires au contrôle (73,23%). L'utilisation de la souche probiotique, *L. plantarum* TN8, conserve ainsi 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.

3. Etude de l'incorporation de la souche probiotique sur les caractéristiques physico-chimiques (pH, TBARS et MetMB) de la viande hachée

Le pH est le paramètre le plus souvent mesuré pour les viandes. Son suivi au cours de la conservation est un moyen de contrôler la qualité et de vérifier la présence des bactéries lactiques. Les résultats trouvés des analyses physico-chimiques montrent que les viandes hachées préparées selon les différentes concentrations de la souche *L. plantarum* TN8 présentent des valeurs initiales de pH comprises entre 5,61 et 5,90. Les échantillons nouvellement formulés présentent des valeurs de pH significativement plus faibles que celle du contrôle. Cette diminution est essentiellement observée dans l'échantillon inoculée avec 10^9 UFC /g de la souche TN8. Cette diminution de pH reflète la production de l'acide lactique par la souche TN8 inoculée. L''acidification du produit a des effets positifs sur la sécurité et sur les caractéristiques sensoriels du produit. En effet, cette diminution du pH dans les produits de charcuterie favorise la coagulation des protéines myofibrillaires, ce qui entraîne une amélioration de la texture, et contribue à la saveur et la couleur rouge. L'inhibition des micro- organismes pathogènes est également fournie par la diminution rapide du pH et la production de l'acide lactique. La diminution rapide des valeurs de pH pendant la fermentation de saucisses peut également contribuer à la prévention de l'accumulation des amines biogènes, qui sont nocifs pour la santé (Ammor et Mayo, 2007).

L'oxydation lipidique a été évaluée par la méthode des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) et la valeur de TBARS est utilisée comme un indicateur de MDA.

Les valeurs de TBARS augmentent jusqu'à 1,50-2,26 mg MDA/kg à la fin du stockage à 4 °C des viandes hachées. Durant toute la durée de stockage, les échantillons dans lesquels on a inoculé la souche TN8 présentent des valeurs de TBARS plus faibles que ceux de l'échantillon contrôle ($P<0,05$). Ces résultats montrent que la souche probiotique, *L.plantarum* TN8, possède un pouvoir antioxydant. Ce dernier peut être dû à la production d'enzymes et d'antioxydants ou à leur capacité à diminuer l'effet de molécules oxydantes ou à leur capacité à la résistance aux radicaux libres.

La formation de MetMb augmente durant la durée de stockage dans tous les échantillons. Le pourcentage de MetMb augmente rapidement dans l'échantillon contrôle jusqu'à 46,03 % après 7 jours de stockage en dépassant la limite recommandée. Alors que les valeurs de MetMb dans les échantillons inoculées avec la souche TN8 (38,18, 32,22et 29,98 pour T1, T2, T3, respectivement) sont inférieures à l'échantillon contrôle ($P<0,05$). La détérioration de la viande se produit après 7 jours de stockage pour l'échantillon témoin et après 10 jours de stockage pour les échantillons inoculés avec la souche TN8.

4 Etude de l'incorporation de la souche probiotique sur le profil textural de la viande hachée

Les propriétés texturales des différents échantillons y compris l'échantillon contrôle (sans la souche TN8) ont été évaluées par des mesures en compression à l'aide d'un analyseur de texture (TA- XT2i, Stable Micro Systems Ltd., Surrey, England) dans les conditions suivantes: la vitesse de pré-test est fixée à 2 mm/s, la vitesse de post-test est 5 mm/s, la vitesse de la tête est de 2 mm/s, la distance de 8 mm, et la force de 5 g. Les valeurs de la dureté, l'élasticité, la cohésion, l'adhésion et la masticabilité des produits ont été déterminés.

La dureté est l'un des paramètres ultimes pour l'évaluation de la texture des viandes. La dureté de l'échantillon T2 et T3 augmente par rapport à l'échantillon témoin ($P<0,05$). La variation de la dureté dépend de la teneur en eau de la viande et de la structure des protéines musculaires (Monin *et al*., 1997). Cependant, l'échantillon contrôle subit une augmentation de l'élasticité et de la masticabilité par rapport aux échantillons

traités avec la souche probiotique TN8 (P <0,05). L'augmentation de l'élasticité est principalement due à la perte d'eau (Essid et Hassouna, 2013). L'analyse instrumentale de la texture de l'échantillon contrôle a montré que la cohésion et l'adhésion ne sont pas affectées par l'incorporation de la souche probiotique TN8 (0,48-0,57 and 0,79-1,25, respectivement)

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 viandes hachées. Cette amélioration peut être due à la capacité des bactéries acido-lactiques de produire des enzymes qui peuvent diminuer l'élasticité des produits de charcuterie (Thi Nguy et Thu, 2008).

5 Etude de l'incorporation de la souche probiotique sur la couleur de la viande hachée

Les différents paramètres de la couleur de la viande ont été déterminés. Les résultats montrent que les échantillons traités avec la souche TN8 ont subi une augmentation de l'indice de rouge (a*) par rapport l'échantillon témoin après 4 jours de stockage à 4 °C (p<0.05). La réduction de l'intensité de la couleur rouge pendant le stockage pourrait vraisemblablement être attribué à l'interdépendance entre l'oxydation des lipides dans les viandes. Les valeurs de la luminosité L* des viandes hachées diminuent après 4 jours de stockage dans les échantillons avec la souche TN8. Cependant, les valeurs de la L* augmente après 7 jours de stockage (48,25-51,63). Concernant l'indice de jaune b *, il n'y avait pas de différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités (p > 0,05). Ainsi, la
souche TN8 maintient l'indice b*.

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).

1 L'auxine

L'objectif de ce volet de travail consistait à l'isolement et au criblage de souches susceptibles de produire le bio-fertilisant 3-indole acide acétique (l'auxine). Dans ce cadre, nous avons criblé deux souches K13 et K43 comme étant les souches potentiellement productrices de l'auxine en milieu liquide. L'observation microscopique montre que la souche K13 est une levure alors que la souche K43 est de genre *Aspergillus*. Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions de production du bio-fertilisant le 3-indole acide acétique (l'auxine) en milieu liquide moyennant la méthodologie facteur par facteur classique. La production de l'auxine (confirmé par HPLC) par la souche K13 est associée à celle de la biomasse et que le niveau de production est maximal (133.2 mg/l) à une taille d'inoculum de 1% après 360 heures de fermentation. L'étude de l'effet de la tryptophane (200, 300, 400 et 500 mg/l) sur la production de l'auxine montre qu'en présence de 500 mg/l, 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 662.13mg/l à une concentration de tryptophane de 400 et 500 mg/l, respectivement.

L'étude de l'effet de l'auxine produit par la souche K13 sur les plantes de blé en absence et en présence de différente concentration de NaCL. L'analyse des paramètres de croissance des plantes de blé est en cours.

2 Optimisation des conditions de production d'un complexe enzymatique par fermentation en milieu semi solide et applications en nutrition animale

Nous avons envisagé de produire un cocktail d'enzyme, qui sera utilisé comme additif en nutrition animale, pour faciliter la digestion des nutriments et augmenter la biodégradation des facteurs anti-nutritionnels. Parmi 32 souches isolées, nous avons criblé deux souches Y3 (champignon) et Y6 (*aspergillus*) comme étant les souches les plus performantes pour la production de xylanase, β- endoglucanase, mannanase et phytase.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions de production de ces enzymes par les deux souches en milieu semi solide ainsi que le substrat de base parmi plusieurs agro ressources : la paille d'orge, la paille d'avoine et les sons de blé, d'avoine et d'orge. La production est nettement supérieure avec le son de blé avec un maximum d'activité pour Y6 (xylanase : 85.92 U/gds, β- endoglucanase : 62.74 U/gds, mannanase : 47.70 U/gds et phytase : 8 U/gds) et Y3 (xylanase : 184.72 U/gds, β-endoglucanase : 27.12 U/gds et phytase : 7.14 U/gds).

L'étude des facteurs affectant la Fermentation semi solide par Y6, moyennant un plan de criblage, a montré que la production de xylnase est fonction de la Taille d'inoculum, l'humidité et Son de blé, celle de β-glucanase est fonction de ces derniers en plus du LBG, celle de β-mannanase est tributaire de la Taille d'inoculum, l'humidité et du LBG alors que celle du phytase est fonction de l'humidité, Son de blé et l'extrait de levure.

En se basant sur ces résultats, un plan Box Bhenken a été appliqué en vue d'optimiser la production de xylanase et β-glucanase. Une condition optimale a été déterminée. D'après le modèle établi, le maximum d'activité est atteint en utilisant le son de blé (3g), une humidité de milieu de 85% et le taille d'inoculum de 4%. La validation de cette condition a permis d'atteindre des activités xylanase et β-glucanase de l'ordre de 569 et 177 U/g respectivement soit 4 et 2 fois plus importantes que celles obtenus en préliminaire. Le criblage des facteurs affectant la production de l'Arabinofuranosidase et l'Acide férulique estérase est en cours. L'effet du prétraitement (2h à 90°c puis lavage) des agroressources sur la production de différentes activités a été réalisé. Cette étude a montrée que le prétraitement du son de blé à permis de multiplier le rendement de production de xylanase de la souche Y6 par 3 soit 2200 U/gds. L'étude du prétraitement des autres ressources et d'autres méthodes de prétraitements telle que l'ultrason sont en cours.

Dans le but d'améliorer la production de 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 %.

L'identification moléculaire de la souche Y6 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 reverse 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.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Publications internationales parues en 2019

1. N. Touj, A. Chakchouk-Mtibaa, L. Mansour, A.H. Harrath , J. Al-Tamimi, L. Mellouli, I. €Ozdemir, S. Yasar, N. Hamdi **(2019)**. Synthesis, spectroscopic properties and biological activity of new Cu(I) N-Heterocyclic carbene complexes. ***Journal of Molecular Structure*** 1181, 209-219.
2. Karim Ennouri · Hajer Ben Hlima · Rayda Ben Ayed · Olfa Ben Braïek · Maura Mazzarello · Ennio Ottaviani · Lotfi Mellouli · Slim Smaoui **(2019)**. Assessment of Tunisian virgin olive oils via synchronized analysis of

3. sterols, phenolic acids, and fatty acids in combination with multivariate chemometrics. ***European Food Research and Technology***. https://doi.org/10.1007/s00217-019- 03303-2
4. Ahlem Chakchouk Mtibaa, Slim Smaoui, Hajer Ben Hlima, Imen Sellem, Karim Ennouri and Lotfi Mellouli **(2019)**. Enterocin BacFL31 from a Safety *Enterococcus faecium* FL31: Natural Preservative Agent Used Alone and in Combination with Aqueous Peel Onion (*Allium cepa*) Extract in Beef Meat Storage. ***BioMed Research International*** Volume 2019, Article ID 4094890, https://doi.org/10.1155/2019/4094890
5. Fatma kaaniche, Hamed Abdelaaty, Ahmed S Abdel-Razek, Wibberg Daniel, Imene Zendah El Euch, Negera Abdissa, Noureddine Allouche, Lotfi Mellouli, Mohamed Shaaban, Nobert Sewald **(2019)**. Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus Curvularia. sp isolated from Rauwolfia macrophylla. ***PLOS ONE.*** https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217627 **June 27, 2019**
6. Aziza Mnasri, A. Chakchouk-Mtibaa, Abdullah Sulaiman AL-Ayed, Mosbah Jemmali, L. Mellouli, Hallouma Bilel and Naceur Hamdi* **(2019)**.Synthesis of New 2-Amino-6-(4-hydroxy-2-oxo-chromen-3-yl)-4-aryl Nicotine Nitrile in Eco-Friendly Media and their Antimicrobials and DPPH Radical Scavenging Activities. ***Asian Journal of Chemistry;*** Vol. 31, No. 7 (2019), 1609-1616.
7. Intissar Kammoun, Imen Sellem, Hajer Ben Saad, Tahia Boudawara, Moncef Nasri, Neji Gharsallah, Lotfi Mellouli, Ibtissem Ben Amara **(2019)**. Potential benefits of polysaccharides derived from marine alga Ulva lactuca against hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by thiacloprid, an insecticide pollutant. ***Environmental Toxicology***. 2019;1–12.
8. Slim Smaoui, Hajer Ben Hlima, Ahlem Chakchouk Mtibaa, Mariam Fourati, Imen Sellem, Khaoula Elhadef, Karim Ennouri, Lotfi Mellouli **(2019)**. ***Review***: Pomegranate peel as phenolic compounds source: Advanced analytical strategies and practical use in meat products. ***Meat Science***. 158 (2019) 107914. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107914
9. Hamida Jelali, A. Chakchouk-Mtibaa, Lasaad Baklouti, Hallouma Bilel, Yaser Bathich, L. Mellouli and Naceur Hamdi **(2019)**. Development of New Multicomponent Reactions in Eco-Friendly Media-Greener Reaction and Expeditious Synthesis of Novel Bioactive Benzylpyranocoumarins. ***Journal of Chemistry*** Volume 2019, Article ID 8693614, https://doi.org/10.1155/2019/8693614.
10. Mariam Fourati, Slim Smaoui, Karim Ennouri, Hajer Ben Hlima, Khaoula Elhadef, Ahlem Chakchouk-Mtibaa, Imen Sellem, and Lotfi Mellouli **(2019)**. Multiresponse Optimization of Pomegranate Peel Extraction by Statistical versus Artificial Intelligence: Predictive Approach for Foodborne Bacterial Pathogen Inactivation. ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*** Volume 2019, Article ID 1542615, https://doi.org/10.1155/2019/1542615
11. Hajer Ben Hlima, Thouraya Bohli, Mariem Kraiem, Abdelmottaleb Ouederni, **Lotfi Mellouli**, Philippe Michaud, Slim Abdelkafi and Slim Smaoui **(2019)**. Combined E_ect of Spirulina Platensis and Punica Granatum Peel Extacts: Phytochemical Content and Antiphytophatogenic Activity. ***Applied Sciences*** Volume 9, 5475, doi:10.3390/app9245475. http://www.mdpi.com/journal/applsci.
12. Mariam Fourati, Slim Smaoui, Hajer Ben Hlima, Karim Ennouri, Ahlem Chakchouk Mtibaa, Imen Sellem, Khaoula Elhadef1 and Lotfi Mellouli **(2019)**. Synchronised interrelationship between lipid/protein oxidation analysis and sensory attributes in refrigerated minced beef meat formulated with Punica granatum peel extract. ***International Journal of Food Science and Technology***. Vol. 54. DOI : 10.1111/ijfs.14398.
13. Lamia Boubakri, A. Chakchouk-Mtibaa, Abdullah S. Al-Ayed, L. Mansour, Nael Abutaha, Abdel Halim Harrath, L. Mellouli, I. ¨ Ozdemir, S. Yasar and Naceur Hamdi **(2019)**. Ru(II)–N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, characterization, transfer hydrogenation reactions and biological determination. ***RSC Advances***. Vol.9, pp. 34406-34420.
14. Ben Salah, H., Smaoui, S., Abdennabi, R., & Allouche, N. **(2019)**. LC-ESI-MS/MS phenolic profile of *Volutaria lippii* (L.) Cass. extracts and evaluation of their in vitro antioxidant, antiacetylcholinesterase, antidiabetic, and antibacterial activities. ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***, Volume 2019, Article ID 9814537, 13 pages. https://doi.org/10.1155/2019/9814537

15. Braïek, O. B., & Smaoui, S., Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed research international*, **2019**. ***BioMed Research International*** Volume 2019, Article ID 5938210, 13 pages, https://doi.org/10.1155/2019/5938210

16. Khemakhem, B., El Abed, H., Chakroun, M., Fendri, I., & Smaoui, S**. (2019).** Functional effects of ice plant amylases on cake and bun quality. ***Food Bioscience***, 29, 142-149. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.008

17. Ennouri, K., Hlima, H. B., Ayed, R. B., Braïek, O. B., Mazzarello, M., Ottaviani, E., & Smaoui, S. **(2019).** Assessment of Tunisian virgin olive oils via synchronized analysis of sterols, phenolic acids, and fatty acids in combination with multivariate chemometrics. ***European Food Research and Technology,*** 245, 1811–1824. https://doi.org/10.1007/s00217-019-03303-2

18. Braïek, O. B., Smaoui, S., Fleury, Y., Morandi, S., Hani, K., & Ghrairi, T. **(2019)**. Bio-guided purification and mass spectrometry characterisation exploring the lysozyme-like protein from *Enterococcus lactis* Q1, an unusual marine bacterial strain. ***Applied biochemistry and biotechnology***, 188(1), 43-53. https://doi.org/10.1007/s12010-018-2886-0

19. Nehal, F., Sahnoun, M., Smaoui, S., Jaouadi, B., Bejar, S., & Mohammed, S. **(2019).** Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. ***Microbial pathogenesis***, 132, 10-19. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.018

20. Braïek, O. B., Mergni, A., Smaoui, S., & Mastouri, M. **(2019).** *Enterococcus lactis* Q1 and 4CP3 strains from raw shrimps: Potential of antioxidant capacity and anti-biofilm activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *LWT* **- *Food Science & Technology, LWT - Food Science & Technology***, 102, 15- 21. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.095

21. Braïek, O. B., Smaoui, S., Ennouri, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Hani, K., & Ghrairi, T. **(2019)**. RAPD-PCR characterisation of two *Enterococcus lactis* strains and their potential on *Listeria monocytogenes* growth behaviour in stored chicken breast meats: Generalised linear mixed-effects approaches. ***LWT - Food Science & Technology***, 99, 244- 253. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.053

22. Amal Feki, Ibtissem Ben Amara, Sana Bardaa, Sawssan Hajji, Naourez Chabchoub, Rim Kallel, Tahia Boudawara, Slim Zghal, Riadh Ben Salah, Moncef Nasri, Naourez Ktari **(2019)** Preparation and characterization of polysaccharide based films and evaluation of their healing effects on dermal laser burns in rats. ***European Polymer Journal*, 115 :** 147-156.

23. Houssam Abouloifa, Yahya Rokni, Reda Bellaouchi, Nabil Ghabbour, Salwa Karboune, Milena Brasca Riadh Ben Salah, Nour Eddine Chihib, Ennouamane Saalaoui and Abdeslam Asehraou**. (2019)**

24. Characterization of Probiotic Properties of Antifungal *Lactobacillus* Strains Isolated from Traditional Fermenting Green Olives. ***Probiotics and Antimicrobial Proteins* 15**:1-14.

25. Anis Ben Hsouna, Rania Ben Saad, Nabil Zouari, Walid Ben Romdhane , Faiçal Brini, Riadh Ben Salah **(2019)** Stress associated protein from *Lobularia maritima*: Heterologous expression, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in beef meat. ***International Journal of Biological Macromolecules*, 132:** 888-896.

26. Imen Trabelsi, Sirine Ben Slima, Naourez Ktari, Mehdi Triki, Rania Abdehedi, Wafa Abaza, Hafedh Moussa, Asehraou Abdeslam, Riadh Ben Salah **(2019)** Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. ***Meat Science*.154**: 29-36.

27. Sirine Ben Slima, Imen Trabelsi, Naourez Ktari, Sana Bardaa, Karim Elkaroui, Mohamed Bouaziz, Asehraou Abdeslam, Riadh Ben Salah **(2019)** Novel *Sorghum bicolor* (L.) seed polysaccharide structure, hemolytic and antioxidant activities, and laser burn wound healing effect. ***International Journal of Biological Macromolecules*, 132:** 87-96.

28. Sirine Ben Slima, Naourez Ktari, Mehdi Triki, Imen Trabelsi, Hafedh Moussa, Skandar Makni, Asehraou Abdeslam, Ana Maria Herrero, Francisco Jiménez-Colmenero, Claudia Ruiz- Capillas, and **Riadh BEN SALAH (2019)** Effects of two fibers used separately and in combination on physico-chemical, textural, nutritional and sensory properties of beef fresh sausage. ***British Food Journal*. 121:**1428-1440.

FORMATION DIPLOMANTE

Thèses

1. Thèse en Sciences Biologiques de Melle Fatma KAANICHE soutenue le **23 / 12 2019** à la Faculté des Sciences de Sfax.

Titre : Purification, identification et activités biologiques de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés.

Encadrement : Pr. MELLOULI Lotfi (CBS) et Pr. ALLOUCHE Noureddine (FSS)

PROJETS NATIONAUX D'OUVERTURE SUR LE MONDE SOCIO-ECONOMIQUE

Cinq conventions de Recherche-développement avec cinq Industriels Tunisiens sont en cours de 2019 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»

PROJETS DE COOPERATION INTERNATIONALE EN COURS OU ACCEPTES EN 2019

→**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 2019: **15 000 DT**

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
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 (MOBIDOC)	CBS
Mouna BEN ELHOUL	Post-Doc (MOBIDOC)	CBS
Rihab AMERI	Post-Doc	CBS
Hatem REKIK	Post-Doc	CBS
Lobna DAOUED	Post-Doc	CBS
Sahar TRABELSI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Sondes MECHRI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Monia MEZGHANI-ABID	Technicien en Chef	CBS
Adel HADJ IBRAHIM	Technicien	CBS
Mouna JLIDI	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Sawssan NEIFAR	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Maroua OMRANE-BENMRAD	Thèse (Génie Chimique-Procédés)	ENIG
Fatma ABDMOULEH	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Sonia MHIRI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Karima SALEM	Thèse (Génie Biologique)	ENIS
Asmahen AKREMI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Sondes HAMDI	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Ahlem DAB	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Wided BRABRA	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS
Fadoua JABEUR	Thèse (Sciences Agronomiques)	INAT
Fakhreddine BEN AMARA	Thèse (Sciences Biologiques)	FSS

OBJECTIFS GENERAUX ET SPECIFIQUES

Le laboratoire LBMIE-CBS, 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 leur production et application. Le criblage de ces enzymes est suivit par une étude approfondie de leurs propriétés biochimiques, moléculaires et structurales. Dans le 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. Ces applications concernent plusieurs secteurs tels que l'agroalimentaire, la tannerie, la détergence et le textile. D'autre part nous développons un projet de la lutte contre le feu bactérien 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 sur trois projets et les résultats obtenus au cours de l'année 2019 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 2019 ont été focalisés sur le criblage, l'étude, l'amélioration et l'application de quelques enzymes destinées à la panification, l'alimentation animale et la production de sirop à haute teneur en fructose.

1- Xylanases et amylases pour alimentation animale et panification

Ce projet comporte plusieurs parties qui s'intéressent au criblage, l'étude l'amélioration et l'application de quelques enzymes destinées notamment à la panification et pour l'alimentation animale.

a/ Etudes de l'effet d'alpha amylase (AmyKS) sur les propriétés rhéologiques de la pâte et du pain

L'objectif principal est de préparer un cocktail enzymatique formé par AmyKS et XAn11 destiné à la panification. Afin d'atteindre cet objectif, une étude de l'effet d'AmyKS sur les propriétés rhéologiques de la pâte et du pain a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que l'AmyKS est capable de réduire le temps de fermentation de la pâte, d'améliorer la texture du pain en augmentant son élasticité et son extensibilité et de prolonger le temps de conservation.

b/ Immobilisation par nanoparticules

L'immobilisation d'enzymes sur des Bio-nanoparticules magnétiques (BMNP) pourrait offrir une réutilisation ainsi qu'une stabilité accrue et un fonctionnement robuste dans différentes conditions physicochimiques des enzymes. Dans ce contexte, les deux enzymes alpha amylase (AmyKS) et la xylanase (XAn11) ont été immobilisées sur des BMNP et évaluées pour leurs activités et stabilités. Les

BMNP-AmyKS ainsi que BMNP-XAn11 ont été caractérisées par diffraction des rayons X (XRD) et analysées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). La quantité d'enzyme immobilisée a été optimisée en faisant varier la concentration enzymatique ainsi que le temps d'incubation pendant le processus d'immobilisation. Ce travail fait l'objet d'un article intitulé : "Improvement of storage stability and reusability of alpha amylase and xylanase immobilized on magnetic nanoparticles using two different strategies " actuellement en rédaction.

c) Xylanase de la souche Caldicoprobacter algeriensis

Dans un travail antérieur, nous avons identifié, cloné et exprimé le gène de xynBCA à partir de la souche *Caldicoprobacter algeriensis* qui code pour un polypeptide de 451 aa. La caractérisation a montré des optima de température et de pH de 80 °C et 6,5 respectivement et qu'elle est thermostable puisqu'elle retient toute son activité après 2h d'incubation à 75 °C. En 2019, l'étude a été consacrée à l'achèvement de la caractérisation de la xylanase recombinante d'une part, et l'application de cette xylanase dans l'opération de blanchissement. Cette étude a montré que le meilleur traitement était obtenu avec 75 U / g pendant 2 h avec une libération importante de sucre réducteur et de chromophores, prouvant respectivement la dégradation du xylane et la libération de lignine. Un article est en préparation sur ce travail

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

Nous avons cloné et exprimé dans un travail antérieur une glucose isomérase (GICA) après séquençage partielle du génome de cette souche. Nous avons également, immobilisé la GICA utilisant des supports en polyméthacrylate (Sepabeads EC-EA et EC-HA) et l'utilisé dans un processus continu de production de sirop à haute teneur en fructose (HFS). En 2019 nous avons achevé ce travail et démontré que nous pouvons obtenir un taux de bioconversion de 49% environ après 48h d'opération. La caractérisation biochimique de l'enzyme adsorbée a révélé qu'elle présente une activité relative supérieure aux pHs acide, une thermostabilité plus élevée et une meilleure stabilité au stockage par rapport au l'enzyme libre. De plus, l'enzyme immobilisée a révélé une excellente stabilité opérationnelle après 15 cycles de réaction successive de 3h à 85 °C dans un réacteur discontinu et ce en préservant 83% de son activité initiale. Grâce à sa bonne thermostabilité à 70 °C, la GICA adsorbée a été appliquée avec succès dans un réacteur à lit fixe pour la production en continu de sirop HFS pendant onze jours avec un taux de bioconversion approximativement constant de 49%. Ce travail a généré un article publié dans Food Chemistry.

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

Après avoir cloné exprimé deux peroxydases une estérase et une ORF (ORF13) révélé dans le clone métagénomique 36A23 nous avons exprimé une autre ORF (l'ORF03) de ce même clone métagénomique. Après expression et purification, l'activité a été recherché sur onze substrats différents à savoir : le xylane, le LBG, l'avicelle, le glucomannane, le galactomannane, l'arabinogalactane, le CMC, la pectine, le xylane, l'amidon ...et ce après incubation pendant une nuit à 37 ° C. Les résultats ont montré l'absence d'activité sur tous les substrats testés excepté une activité relativement faible sur la pectine. La caractérisation approfondie de l'enzyme exprimé est en cours.

f) la CGTase US132 et ses applications

f-1) Application en panification

Nous avons décrit antérieurement la génération d'un triple mutant par la méthode de mutagenèse aléatoire de la CGTase US132 isolée au niveau de notre laboratoire (Jemli et al., 2007 ; Jemli et al., 2008). Ce triple mutant (K47E, S382P et N655S) appelé MJ13 a montré une bonne performance en tant qu'agent anti-rassissant suite à un changement de la spécificité de l'enzyme mutée vers la dextrinisation avec diminution de l'activité de cyclisation. Nous nous avons généré également les 3 simples mutants (K47E, S382P et N655S) ainsi que les 3 combinaisons de double mutants (K47E+S382P, K47E+N655S, and S382P+N655S). Par la suite, les 6 CGTases mutées ont été extraites, purifiées, caractérisées biochimiquement et comparées avec la CGTase sauvage recombinante (TUN_pSJ8) et avec le double

mutant (MJ13). L'analyse a montré que les 6 mutants générés engendre une amélioration du rapport dextrinisation/cyclisation qui varie entre 4,5 – 9 fois et ce, en comparaison avec l'enzyme sauvage (TUN_pSJ8). Parmi ces 6 mutants, le mutant portant la substitution N655S (TUN_NS) a montré la meilleure amélioration (9 fois). Les résultats de tests de panification ont montré que l'addition de 0,06 unité/g de farine a diminué aussi bien la dureté de la pâte ainsi que du pain d'une façon plus remarquable que celle montré par l'enzyme sauvage. Ceci nous a permis de mentionner que le mutant TUN-NS pourrait être un agent anti-rassissant très performant et ce, jusqu'à confirmation des tests de panification réelle et en utilisant différents doses de l'enzyme. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique qui est cours de finalisation.

f-2) Application pour la production des cyclodextrines et leurs nanoparticules

Les nanoparticules à base de cyclodextrines est une technologie émergeante qui trouve un essor considérable permettant de contourner les problèmes liés à la faible solubilité et stabilité des molécules bioactives et d'améliorer la diffusion contrôlée des médicaments. Après purification des cyclodextrines, les nanoparticules seront générées via des méthodes physiques et/ou chimiques et des tests pharmacologiques des nanoparticules complexés avec différentes molécules bioactives peuvent être envisagés. En 2019, nous avons d'une part commencé les expériences d'amélioration de production de l'enzyme et l'optimisation de production des beta-cyclodextrines d'autre part. Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet, intitulé : « Les cyclodextrines comme vecteurs d'encapsulation des molécules bioactives : production, purification et génération des nanoparticules » ; porté par Dr Sonia JEMLI (2020-2021).

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, Dr. Zaraî Jaouadi N, Dr. Frikha F, Dr. Kamoun F, Dr. Ayadi Zouari D, Dr. Rekik H, Dr. Ben Elhoul M, Dr. Mechri S & Dr. Omrane Benmrad M.
Doctorants mobilisés : Jabeur F, Hamdi S & Dab A
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'intérêt industriel

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) Procédés de production et de purification des enzymes protéolytiques – Application industrielle dans le domaine des détergents et agroalimentaire

Dans ce travail, trois protéases SPPS, SAPTEX et SPTC secrétées respectivement par les souches fongiques *Pleurotus sajor-caju* CTM 10057, *Penicillium chrysogenium* X5 et *Trametes cingulata* CTM 10101 ont été purifiées et caractérisées. Ces protéases présentent une stabilité remarquable en présence des surfactants, des tensioactifs et certains détergents commerciaux liquides et solides. D'après l'évaluation morphologique, la physico-chimique et l'évaluation métrologique des tissus traitées par SAPTEX, cette enzyme est orientée d'être appliquée dans le processus d'ennoblissement. SPPS possède un degré d'hydrolyse notable. Etant donné que cette protéase est une enzyme acido-résistante, d'où l'idée qu'elle soit apposée pour la coagulation de lait. Grâce à ces propriétés intéressantes de SPPS dans la coagulation du lait, nous pensons à monter une start-up « AgroTN BioTech » et contribuer à une étude technico-économique afin d'avoir une estimation du coût de la production de SPPS et de voir la possibilité de son utilisation dans la coagulation du lait. Les résultats du modèle obtenu suite à l'étude technico-économique développée a permis de bien confirmer l'intérêt financier de produire cette enzyme.

Cette simulation effectuée montre une production de 75000 U/mL obtenues après 72 h de fermentation.

b) Etudes biochimiques et moléculaires des protéases bactériennes issues des milieux extrêmes d'intérêts biotechnologiques

Une optimisation des conditions de la production de protéases à partir des souches de l'extrême (eau chaude algérien, gisement pétrolier tunisien et deux lacs salins algériens) a été réalisée, à l'échelle Erlenmeyer. Ainsi, des protéases prometteuses produites par les souches *Aeribacillus pallidus* VP3, *Lysinibacillus fusiformis* C250R, *Anoxybacillus kamchatkensi* M1V, *Virgibacillus natechei* sp. nov FarD^T et *Melghiribacillus thermohalophilus* gen. nov., sp. nov Nari2A^T ont été purifiées et caractérisées. Ces enzymes sont des condidates potentielles pour la détergence et la déprotéinisation de coproduits de la mer. Les gènes codants pour les activités SAPA, SAPV et SAPN respectivement de M1V, FarD^T et Nari2A^T ont été isolés, étudiés sur le plan structural et exprimés dans *E. coli*. Le gène codant pour SAPN a été exprimé dans *P. pastoris* SMD1168 et X-33 sous ces trois cassettes de lectures (SAPN + PS + Pro), (SAPN + Pro - PS) et (SAPN - Pro - PS) par électroporation des plasmides dérivés du PICZαC. Par la suite, l'enzyme rSAPN X-33 (Pro-M5) est purifiée sur une colonne chromatographique d'affinité Ni²-NTA. Les protéases SPVP, SAPLF, rSAPA, et rSAPV présentent une stabilité remarquable en présence de divers détergents. Des meilleurs taux de déprotéinisation enzymatique des sous-produits de crustacés avec une récupération des chitines de bonne qualité ont été trouvés par l'extrait brut de M1V et par SAPN. Des fractions peptidiques à partir des déchets de crevettes, obtenues avec un hydrolyse par les protéases purifiées SPVP et SAPA présentent des peptides (15 et 1,42 kDa) possèdent des activités biologiques très intéressantes. A notre connaissance, le potentiel inhibiteur des activités tyrosinases et acétylcholinestérases d'un hydrolysat protéique obtenu à partir d'un coproduit marin a été signalé pour la première fois au cours de ce travail.

c) Formulation et concentration des préparations enzymatiques (rSAPRH et rKERDZ) par atomisation ou lyophilisation à l'UVRR-CBS en vue d'une meilleure conservation

La protéase rSAPRH (445 000 U/mL) et la kératinase rKERDZ (740 000 U/mL) atomisées ou lyophilisées ont été incorporées en présence ou en absence de 1% de polyol (Maltodextrin ou PEG 8000) et 2 mM $CaCl_2$ et laissées six mois à température ambiante. Cette partie de formulation et concentration des préparations de rSAPRH et rKERDZ a été réalisée à l'échelle laboratoire au LBMIE-CBS et à l'échelle pilote à l'Unité Spécialisée UVRR-CBS. (i) Mise au point d'un milieu économique de production d'enzyme à base de lait en poudre en erlenmeyer (1 litre) et en fermenteur (100 litres), (ii) Extrapolation de la production d'enzyme à l'échelle pilote en fermenteurs (100 litres), (iii) Formulation d'enzyme à l'échelle pilote et (iv) Concentration d'enzyme à l'échelle pilote. L'absence des activités collagénases conforte l'utilité potentielle de ces deux enzymes (rSAPRH et rKERDZ) dans l'industrie du traitement du cuir surtout lors des étapes d'épilage/confitage enzymatiques

2/ Les oxydoréductases fongiques d'intérêts biotechnologiques et environnementales

Les enzymes ligninolytiques sont essentiellement, mais pas exclusivement, sécrétées par les champignons de la pourriture blanche. Ces protéines permettent à ces basidiomycètes de décomposer cette macromolécule qui est la lignine du bois en unités plus simples afin de pouvoir les utiliser comme source de carbone organique. La lignine, dont le nom provient du latin lignum signifiant bois, est la source de carbone organique la plus abondante après la cellulose. Elle présente une structure fortement diversifiée. Cette structure pouvant varier très largement en fonction de l'espèce l'ayant produite. Cela dit, on retrouve généralement trois unités primaires pouvant être identifiées grâce à la présence et la position de groupements méthoxy et qui sont l'alcool paracoumarylique (*p*-coumarylalcohol), l'alcool coniférylique (coniferylalcohol) et l'alcool sinapylique (sinapylalcohol). Le bois dispose de nombreux atouts qui en font un matériau idéal pour la construction. Nous nous sommes donc intéressés dans ce travail à l'identification des souches fongiques peroxyolytiques. Ainsi, deux peroxydases purifiées, issues des deux champignons *Tramates cingulata* CTM10101 et *Aspergillus niger* CTM10002, présentent des masses moléculaires d'environ 41 et 30 kDa, respectivement. Il s'agit de deux vraies peroxydases par la détermination des séquences NH2-terminales des enzymes LiP TC41 et MnP AN30.

En effet, les séquences NH_2-terminales ainsi obtenues ont montré une forte homologie avec les séquences de peroxydases, à lignine et à manganèse, fongiques déjà étudiées. Il s'agit aussi de deux peroxydases hémiques du fait qu'elles sont totalement inhibées par le cyanure de potassium et l'azoture de sodium. 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 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 2019, ce travail a abouti à la publication de 15 articles et de 5 chapitres d'ouvrage scientifique ainsi que 2 brevets d'invention INNORPI. En plus de la clôture du projet tuniso-algérien code TA/04/2012 (2012-2018) et du renouvellement du projet PNRI dégraissage-reverdissage entre LBMIE-CBS/CNCC/LBGEL-ENIS et la société SO.SA.CUIR (2016-2020) et la signature, le 13/11/2018, d'une convention de recherche collaborative entre le LBMIE-CBS et la société de détergence EJM. En plus de l'acceptation du Projet PHC MAGHREB Transversal 2020-2022, code 01MAG20.

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)

Cette année nous avons étudié six phages (ϕ8 / ϕ 17 / PEa7 / MVE / Fϕ1 et ϕ4) isolé d'échantillons de sol et de tissus végétaux prélevés dans différents vergers du nord de la Tunisie en enrichissant les échantillons avec *Erwinia amylovora* Ea, la première souche tunisienne isolée. Quatre phages (ϕ8 / ϕ 17 / PEa7 et ϕ4) ont été isolés du sol recueilli sous les poiriers brûlés et deux phages (MVE / Fϕ1) des pousses de poire. Les phages isolés forment des petites plages de lyses troubles de 0,5 à 1,1 mm de diamètre sur cultures bactriennes après 24 h d'incubation à 25 ° C.

La sensibilité bactérienne a été caractérisée en fonction de la capacité du phage à infecter des hôtes spécifiques pour former des plages de lyses. Les six souches d'*Erwinia amylovora* isolées des différentes régions de la Tunisie ont été testées pour leur sensibilité aux phages. Tous les phages ont formé une zone inhibitrice sur les différentes souches d'*Erwinia amylovora*. Cependant, les isolats de phages testés n'étaient pas seulement capables de lyser les souches Tunisiennes d'*E. Amylovora* mais d'autre isolées à travers le monde.

D'autres espèces *d'Erwinia*, comme *Erwinia mallotiva* LMG1271 et *Erwinia caratovora* en plus de *Dicheya chrysantheni LMG 2804, Pantoea agglomerans LMG2660, Pantoea agglomerans LMG* 2570, *Dicheya dianthicola* LMG 2485, *Dicheya dadantii* CFBP 3855 et *Agrobacterium radiobacter* ST0717 / 0025 étaient résistants à tous les phages.
La cinétique d'adsorption des phages, a été déterminée et nous avons remarqué que Les six isolats de phages avaient une croissance similaire en une étape, montrant une période de latence de 40 à 50 min, une période de montée de 20 min et une taille moyenne de rafale d'environ 122 phages par cellule.

Analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique des phages

L'ADN génomique directement isolé des particules des phages n'a pas été affecté par la dégradation de la DNase I, de la RNase A et d'un ensemble de cinq enzymes de restriction différentes. Cependant, une endonucléase d'ADNsb, la nucléase du haricot mungo, a pu digérer complètement l'ADN.

Le génome de l'ADN des phages a été séquencé en utilisant une plate-forme MiniSeq Illumina NGS. Le génome se compose de 6053, 6801, 6646 et 5678 nucléotides pour Fϕ1, MVE, ϕ8 et (PEa7, ϕ4, ϕ17), respectivement. Tous les génomes des phages ont une teneur en G + C de 46,95%.

Les dix ou onze cadres de lecture ouverts (ORF) qui ont été identifiés dans les différents phages annotés et comparés par BLASTp ont été identifiées dans des génomes du phage filamenteux Ike des *Enterobacteriacea*. Ce phage est l'un des nombreux virus bactériens non enveloppés qui encapsulent un

génome viral simple brin circulaire dans la coquille de la capside du phage. La coquille d'Ike d'*Enterobacteriacea* comprend environ 3100 copies de la protéine d'enveloppe principale IKe (Xu et al., 2019). L'annotation du phage a révélé trois types de phages suite à la similitude entre (MVE et ϕ8) et (PEa7, ϕ17 et ϕ4) alors que Fϕ1 forme une catégorie différente. Les ORF prévus pourraient être disposés dans une structure modulaire similaire à celle des phages filamenteux IKe précédemment caractérisés avec des différences structurelles dans certaines régions variables contenant la protéine de capside mineure et majeure et la protéine binging de l'ADNsb.

Ces régions sont déplacées dans le phage Fϕ1 par rapport aux autres phages qui présentent une architecture génomique similaire par rapport à IKe.

Bio-essais sur des tranches de poires

Les effets de la combinaison de phages (ϕ8 / ϕ 17 / PEa7 / MVE / ϕ4 / F ϕ1) ont été testés sur des tranches de fruits non mûres du cultivar de poire *Pyrus x communis L.*'conference', décrites par Schwarczinger et al., (2017). Les poires ont été évaluées pour les symptômes d'infections en mesurant la zone infectée et en calculant le pourcentage de tissu infecté.

Un essai biologique pour déterminer l'efficacité du cocktail de phages a été effectué en évaluant le développement des symptômes, dans les tranches de poire (Conférence), pour leur capacité à réduire ou à empêcher la macération de la tranche de poire par la souche *Erwinia amylovora* Ea. La sévérité des symptômes a été réduite sur le cultivar de poire par rapport au témoin positif. Le résultat a montré que le traitement par phage de tranches de poire à différentes concentrations (10^6, 10^7 et 10^8 PFU / ml) est capable de réduire l'effet d'*Erwinia amylovora*. Le résultat statistique a montré que la combinaison d'infection présente une valeur de p significative.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

I/ Publications parues en 2019 dans des revues scientifiques indexées à comité de lecture et à IF

1- **Neifar S, Hajer Ben Hlima, Sonia Mhiri, Monia Mezghani, Khelifa Bouacem, Adel Hadj Ibrahim, Bassem jaouadi, Amel Bouanane-Darenfed, Samir Bejar (2019):** A novel thermostable and efficient Class II glucose isomerase from the thermophilic *Caldicoprobacter algeriensis*: Biochemical characterization, molecular investigation, and application in High Fructose Syrup production. **Journal: International Journal of Biological Macromolecules.129(2019) 31-40**

2- **Neifar S, Cervantes FV, Bouanane-Darenfed A, BenHlima H, Ballesteros AO, Plou FJ, Bejar S. (2019)** Immobilization of the glucose isomerase from *Caldicoprobacter algeriensis* on Sepabeads EC-HA and its efficient application in continuous High Fructose Syrup production using packed bed reactor. **Food Chem. 2020 Mar 30;309:125710. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125710. Epub 2019 Oct 19**

3- **Trabelsi S, Ben Mabrouk S, Kriaa M, Ameri R, Sahnoun M, Mezghani M, Bejar S. (2019)** The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated Bacillus subtilis strain US586. **J Food Biochem. 2019 May; 43(5):e12826.**

4- **Omrane Benmrad M, Mechri S, Zaraî Jaouadi N, Ben Elhoul M, Rekik H, Sayadi S, Bejar S, Kechaou N, Jaouadi B.(2019)** Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnol. 2019 Jul 1;19(1):43. doi: 10.1186/s12896-019-0536-4.**

5- **Hatem Rekik**, **Nadia Zaraî Jaouadi**, **Khelifa Bouacem**, **Bilal Zenati**, **Sidali Kourdali**, **Abdelmalek Badis**, **Rachid Annane**, **Amel Bouanane-Darenfed**, **Samir Bejar**, **Bassem Jaouadi**, **(2019)** Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization . **International Journal of Biological Macromolecules 125 (2019) 514–525**

6- **Hatem Rekik**, **Nadia Zaraî Jaouadi , Fares Gargouri**, **Wacim Bejar**, **Fakher Frikha**, **Najah Jmal, Samir Bejar, Bassem Jaouadi, (2019)** Production, purification and biochemical

characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis* strain RH12. **International Journal of Biological Macromolecules 121 (2019) 1227–1239**

7- **Hatem Rekik**, **Fakher Frikha**, **Nadia Zaraî Jaouadi**, **Fares Gargouri**, **Najah Jmal**, **Samir Bejar**, **Bassem Jaouadi (2019)** Gene cloning, expression, molecular modeling and docking study of the protease SAPRH from *Bacillus safensis* strain RH12 **International Journal of Biological Macromolecules 125 (2019) 876-891**

8- **Mechri S, Bouacem K, Zaraî Jaouadi N, Rekik H, Ben Elhoul M, Omrane Benmrad M, Hacene H, Bejar S, Bouanane-Darenfed A, Jaouadi B.(2019)** Identification of a novel protease from the thermophilic ***Anoxybacillus kamchatkensis*** **M1V an**d its application as laundry detergent add*itive.* **Extremophiles.** ***2019*** **Nov; 23(6):687-706.**

9- **Mechri S, Bouacem K, Jabeur F, Mohamed S, Addou NA, Dab A, Bouraoui A, Bouanane-Darenfed A, Bejar S, Hacène H, Baciou L, Lederer F, Jaouadi B. (2019)** Purification and biochemical characterization of a novel thermostable and halotolerant subtilisin SAPN, a serine protease from *Melghiribacillus thermohalophilus* Nari2A^T for chitin extraction from crab and shrimp shell by-products. **Extremophiles**. **2019 Sep;23(5):529-547. Nehal F, Sahnoun M, Smaoui S, Jaouadi B, Bejar S, Mohammed S. (2019)** Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from Lactococcus lactis F-mou. **Microb Pathog. 2019 Jul;132:10-19.**

10- **Nehal F, Sahnoun M, Dab A, Sebaihia M, Bejar S, Jaouadi B. (2019)** Production optimization, characterization, and covalent immobilization of a thermophilic *Serratia rubidaea* lipase isolated from an Algerian oil waste. **Mol Biol Rep. 2019 Jun;46(3):3167-311.**

11- **Mechri S, Bouacem K, Amziane M, Dab A, Nateche F, Jaouadi B**. **(2019)** Identification of a New Serine Alkaline Peptidase from the Moderately Halophilic *Virgibacillus natechei* sp. nov., Strain FarD^T and its Application as Bioadditive for Peptide Synthesis and Laundry Detergent Formulations. **Biomed Res Int. 2019 Nov 30; 2019:6470897. doi: 10.1155/2019/6470897.**

12- **Yahiaoui M, Laribi-Habchi H, Bouacem K, Asmani KL, Mechri S, Harir M, Bendif H, Aïssani-El Fertas R, Jaouadi B. (2019)** Purification and biochemical characterization of a new organic solvent-tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. **Carbohydr Res. 2019 Sep 1; 483:107747. doi: 10.1016/j.carres.2019.107747.**

13- **Allala F, Bouacem K, Boucherba N, Azzouz Z, Mechri S, Sahnoun M, Benallaoua S, Hacene H, Jaouadi B, Bouanane-Darenfed A. (2019)** Purification, biochemical, and molecular characterization of a novel extracellular the*rmostable and alkaline α*-amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. **Int J Biol Macromol. 2019 Jul 1;132:558-574. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.201. Epub 2019 Mar 27.**

14- **Sara Mohamed, Khelifa Bouacem, *Sondes Mechri, Nariman* Ammara Addou, Hassiba Laribi-Habchi, Marie-Laure Fardeau, Bassem Jaouadi, Amel Bouanane-Darenfed & Hocine Hacène.** Purification and biochemical characterization of a novel acido-halotolerant and thermostable endochitinase from *Melghiribacillus thermohalophilus* strain Nari2A^T. ***Carbohydr Res*** 473 (**2019**) 46-56.

15- **Hamiche S, Mechri S, Khelouia L, Annane R, El Hattab M, Badis A, Jaouadi B. (2019)** Purification and biochemical characterization of two keratinases from Bacillus amyloliquefaciens S13 isolated from marine brown alga Zonaria tournefortii with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities. *Int J Biol Macromol.* ***2019 Feb 1;122:758-769. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.174. Epub 2018 Oct 31.***

16- **Fatima Nehal, Mouna Sahnoun, Slim Smaoui, Bassem Jaouadi, Samir Bejar & Sebaihia Mohammed.** Characterization, high production and antimicrobial activity of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* F-mou. ***Microbial Pathogen*** 132 (**2019**) 10-19.

17- **Sonia Hamiche, Sondes Abdelmalek Badis, Bassem Jaouadi, Naima Bouzidi, Yasmina Daghbouche, Margita Utczás, Luigi Mondello & Mohamed El Hattab.** Identification of antimicrobial volatile compounds produced by the marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain S13 newly isolated from brown alga *Zonaria tournefortii*. ***J Essential Oil Res*** 31 (**2019**)

203-210.

18- Christophe Riccoa, Fatma Abdmouleha, Charlotte Riccobonoa, Léna Gueninechea, Frédérique Martinc, Elizabeth Goya-Jorged, Nathalie Lagardea, Bertrand Liagrec, Mamdouh Ben Ali, Clotilde Ferroud, Mehdi El Arbib, Maité Sylla-Iyarreta Veitía. 2019. **Pegylated triarylmethanes: Synthesis, antimicrobial activity, antiproliferative behavior and in silico studies**. Bioorganic Chemistry. DOI: 0.1016/j.bioorg.2020.103591

19- Lobna Daoud, and Mamdouh Ben Ali. 2019. **Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment**. Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. ISBN: 9780128183229

II/ Publications dans des actes de colloques internationaux

1. **Bassem Jaouadi, Khelifa Bouacem, Hatem Rekik, Nadia Zaraî Jaouadi, Samir Bejar, Rachid Annane, Abdelmalek Badis & Amel Bouanane-Darenfed.** ***Biotechnological properties of new microbial peroxidases for lignin and humic acid biodegradation and biodeterioration***. (**2019**) 1-5 (id305). Proceedings of Euro-Mediterr**anean Conference for Environmental Integration (EMCEI-2), Tunisia 2019.** https://www.emcei.net/. Chapitre de livre accepté le 19 Juillet 2019 pour publication par Springer Nature.
2. **Nadia Zaraî Jaouadi, Mouna Sahnoun, Hatem Rekik, Mouna Ben Elhoul, Haifa Khemir Ezzine, Neila Miled, Samir Bejar & Bassem Jaouadi.** ***Expression of mutated sapB-N99Y keratinase in Bacillus subtilis DB430 and its attractive properties for soaking of hides and skins in leather processing industry***. (**2019**) 1-5 (id473). Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI-2), Tunisia 2019. https://www.emcei.net/. Chapitre de livre accepté le 19 Juillet 2019 pour publication par Springer Nature.
3. **Mouna Ben Elhoul, Nadia Zaraî Jaouadi, Hatem Rekik, Maroua Omrane Benmrad, Sondes Mechri, Haifa Khemir Ezzine, Neila Miled, Samir Bejar & Bassem Jaouadi.** Environmentally-friendly approach of unhairing of goat and cow skins for leather processing using a new actinobacteria keratinase. (2019) 1-5 (id409). Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI-2), Tunisia 2019. https://www.emcei.net/. Chapitre de livre accepté le 19 Juillet 2019 pour publication par Springer Nature.
4. **Sondes Mechri, Imen Sellem, Khelifa Bouacem, Fadoua Jabeur, Hocine Hacene, Samir Bejar, Amel Bouanane-Darenfed & Bassem Jaouadi.** ***Anti-oxidant and anti-enzymatic assessment of white shrimp, Metapenaeus monoceros by-product hydrolysates elaborated by bacterial proteases***. (**2019**) 1-5 (id284). Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI-2), Tunisia 2019. https://www.emcei.net/. Chapitre de livre accepté le 19 Juillet 2019 pour publication par Springer Nature.
5. **Maroua Omrane Benmrad, Mouna Kriaa, Sondes Mechri, Samir Bejar, Ayda Baffoun, Riadh Zouari, Nabil Kechaou & Bassem Jaouadi.** ***Development of environmentally-friendly enzymatic process for the for the treatment of textile finishing spotting-stains using statistical design***. (**2019**) 1-5 (id570). Proceedings of Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration (EMCEI-2), Tunisia 2019. https://www.emcei.net/. Chapitre de livre accepté le 19 Juillet 2019 pour publication par Springer Nature.

III- Brevets déposés en 2019 (INNORPI et autres organismes internationaux)

1. **Mechri Sondes, Bouacem Khalifa, Jabeur Fadoua, Mohamed Sara, Ammara Addou Nariman, Dab Ahlem, Bouanane Darenfed Amel, Samir Bejar, Hacene Houcine, Bassem Jaouadi :** Une nouvelle activité subtilisine bactérienne prometteuse ayant un intérêt ecologique ntiel. **Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 13 Juin 2019 TN 2019-0183**
2. **Mechri Sondes, Bouacem Khalifa, Amziane Meriam, Dab Ahlem, Bejar Samir, Nateche Farida, Bassem Jaouadi :** Une nouvelle peptidase bactérienne exeptionelle ayant un fort potentiel industriel**. Brevet d'Invention INNORPI TUNISIE déposé le 28 Juin 2019 TN 2019-0199**

FORMATION DIPLOMANTE

1- Liste des thèses soutenues en 2019

1. **Sondes Mechri : «** Etudes biochimiques et moléculaires des protéases bactériennes issues des milieux extrêmes d'intérêts biotechnologiques » **(FSS/Université de Sfax: Thèse de doctorat en Sciences Biologiques. Discipline : Biotechnologie Microbienne soutenue le 30/11/2019).**
2. **Sahar Trabelsi : «** Alpha Amylase Améliorants de Panification : Criblage, Caractérisation, Expression, Production et Application » **(ENIS: thèse en Génie Biologique : 14/09/2019)**

2- Liste des mastères soutenus en 2019

1. **Ines GHARBI : «** *Evaluation des activités biologiques de l'hydrolysat protéique des coproduits de crabe bleu* » **(ISBS/Université de Sfax: Master professionnel en Biotechnologie Médicale de l'ISBS soutenu le 02/11/2019).**
2. **Maroua KADDOURI :(ISBS/Université de Sfax: Master professionnel en Biotechnologie Médicale de l'ISBS soutenu le 12/10/2019).**

CONVENTIONS & PROJETS NATIONAUX D'OUVERTURE SUR L'ENVIRONNEMENT SOCIO-ECONOMIQUE

→Projets de Collaboration Recherche/Entreprise au sein et autour des technopôles ; Mécanisme du PAQ et dans le cadre de PromESsE : le PAQ-Collabora (PAR&I-Tech) Intitulé du projet: « ***Développement de produits biotechnologiques innovants à intérêt industriel*** ». Acronyme du projet: « **BIOTECH-INNOV**».
Durée totale du projet (en nombre de mois) : **36 (2019-2023)**
Date de démarrage : **10 Mai 2019.**
Montant du financement du projet : ~ **345 M DT**

→ Convention de coopération de recherche scientifique entre le LBMIE-CBS et la Société de Détergence JMAL (EJM) 2018-2019
- Intitulée de la convention : « 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 de signature de la convention : **13 Novembre 2018**
- Coordinateur scientifique de la convention : **Dr. Bassem JAOUADI**
- Membre d'équipe de la convention : Pr Samir BEJAR, Dr. Bassem JAOUADI, Mme Monia MEZGHANI ABID, Mr. Adel HADJ BRAHIM & un Post-Doc
- Durée totale du projet (en nombre de mois) : **8**
- Montant du financement : **9 520 DT.** Virement en 2019 (première tranche): **5 000 DT**

→ 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.

→ Renouvellement du projet MOBIDOC/Post-Doc (session 2018) 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* ». Responsable Professionnel : Dr. Bassem JAOUADI.

→ Renouvellement du projet MOBIDOC/Post-Doc (session 2017) 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* ». Responsable Professionnel : Dr. Bassem JAOUADI.

→Convention de recherche MOBIDOC/Post-Doc 2018-2019 : 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 Responsable Professionnel : Dr. Aida HMIDA-SAYARI

→Projet de Programme d'Encouragement des Jeunes Chercheurs PEJC, 2ème Edition (2019)
Titre du projet : **«Caractérisation biochimique et moléculaire de nouvelles peroxydases**

microbiennes d'intérêt industriel dans la valorisation et la dégradation de la lignine» « Code : 19PEJC07-10 ». Responsable : Dr. Nadia ZARAI JAOUADI. Montant de financement pour l'année 2019: **10 000 DT**

→Projet de Programme d'Encouragement des Jeunes Chercheurs PEJC, 2ème Edition (2019)

Titre du projet : **«Les cyclodextrines comme vecteurs d'encapsulation des molécules bioactives : Production, purification et génération des nanoparticules ». Responsable : Dr. Sonia Jemli.** Montant de financement pour l'année 2019: **10 000 DT**

SEMINAIRES, JOURNEES ET ATELIERS SCIENTIFIQUES EN 2019

1. Organisation du 18ème **Journées Internationales de Biotechnologie (IDB2019/JIB 2019)** 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; Dr Bassem JAOUADI: Membres du comité scientifique et d'organisation**.
2. Organization of **Second Mediterranean Congress on Biotechnology (MCB2),** March 16th- 20th, 2019hôtel Saphir palace Hammamet, Tunisia. **Chairman: Prof Samir BEJAR**, **Member of Scientific comity: Dr Bassem Jaouadi**

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 : Ahmed Rebai, Sabeur Masmoudi, Mohamed Sami Aifa, Manel Turki.
Maitre-Asistants: Najla Kharrat, Sami Mnif, Mariem Ben Said, Mohamed Ali Mosrati, Dorra Driss, Adel Tekari, Imen Ayedi, Imen Benrebeh, Boutheina Cherif, Soumaya Triki
Cadres technique 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 : Hana Triki, Amal Souissi, Hela Gargouri, Amal Bouzid, Marwa Jardak, Mariem Ayedi, Mariem Moalla, Nadia Ayadi, Ikhlass Ben Ayed, Marwa Ghariani, Nesrine Sghaier.

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)

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 projet 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.

Nous avons ainsi pu colliger dans notre base de maladies cardiovasculaires (220 Coronariens et 150 patients atteints d'insuffisance cardiaque). Les protéines impliquées dans l'activité antioxydante telle que l'activité antioxydante totale (TAS), le GPx et le SOD ont été totalement analysées par la technique ELISA. Les résultats de l'analyse préliminaire montrent qu'ils sont associés à la maladie. D'autres marqueurs, intervenant dans la réaction inflammatoire ont été également dosés (ProBNP ou IL6). Dans ce contexte, un article est en cours de rédaction.

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 (300 Coronarien, 150 Insuffisance cardiaque). L'analyse de d'ADN 16s microbiale à partir de la salive de patients coronariens par la technique de séquençage à haut débit a été effectué. Un pipeline bioinformatique a été mis en place pour cette action. Un article également est en cours de rédaction.

Les délais des actions préconçus au niveau du contrat programme ont été respectés dans leur achèvement.

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

Optimisation de la formation des biofilms par les plans d'expériences **:**

Deux modèles de souches filmogènes déjà disponibles au Laboratoire représentés par les souches GRAM+ *S. epidermidis* S61 et GRAM- *P. aeruginosa*PAO1. Ces modèles servent pour le criblage de molécules naturelles ou de synthèse actives contre la formation de biofilms par ces deux souches. L'optimisation de la formation des biofilms par S61 et PAO1 moyennant l'utilisation d'un plan factoriel complet et les conditions de culture optimales ont été déterminées pour ces deux modèles.

Recherche de gènes impliquées dans la formation de biofilm chez S. epidermidis S61

L'absence du locus icaADBC chez *S. epidermidis* a été confirmée en comparaison avec la souche *S. aureus* servant comme contrôle positif. Cependant, les gènes codant pour les protéines Aap, Bhp et AtlE ont pu être amplifiés ce qui confirme éventuellement l'implication potentielle de ces protéines dans les étapes précoces d'adhésion cellulaire et la formation de biofilm par S61.

Contrôle du système de communication QS par des métabolites produits par les microorganismes endophytes (collection déjà construite au laboratoire)

A part les métabolites secondaires qu'on a pu purifier à partir des cultures des microorganismes endophytes, et confirmer leurs potentiels pour contrôler les biofilms, nous nous sommes intéressés aux enzymes QQ (Quorum quenching). Les QQ peuvent contrôler les systèmes de communications bactériens de type quorum sensing (QS), par la dégradation des autoinducteursde type HSL, et éléments clés de la signalisation cellulaire bactérienne. La recherche et le criblage de souches endophytes qui dégradent les auto-inducteurs de typehomosérine lactoneslargement impliquées dans les systèmes de communications de type QS chez les bactéries GRAM- ont été effectués.

Deux souches endophytiques du genre Bacillus ont été retenues. Leurs potentiels d'inhiber la formation de biofilm et la production de pyocyanine (facteur de virulence contrôlés par le QS) ont été évalués. Enfin, l'amplification des gènes aiia codant pour les lactonases à partir des endophytes sélectionnées a été effectuée. Les ADNs génomiques des souches endophytiques sélectionnées ont montré une amplification positive ce qui pourrait justifier la présence d'enzymes lactonases après culture de ces souches en présence des HSL.

Les lactonases des endophytes peuvent contrôler le système de communication QS par la dégradation des HSL et inhiber ainsi la formation du biofilm et la production des facteurs de virulence, offrant ainsi une piste intéressante pourle contrôle des biofilms microbiens.

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

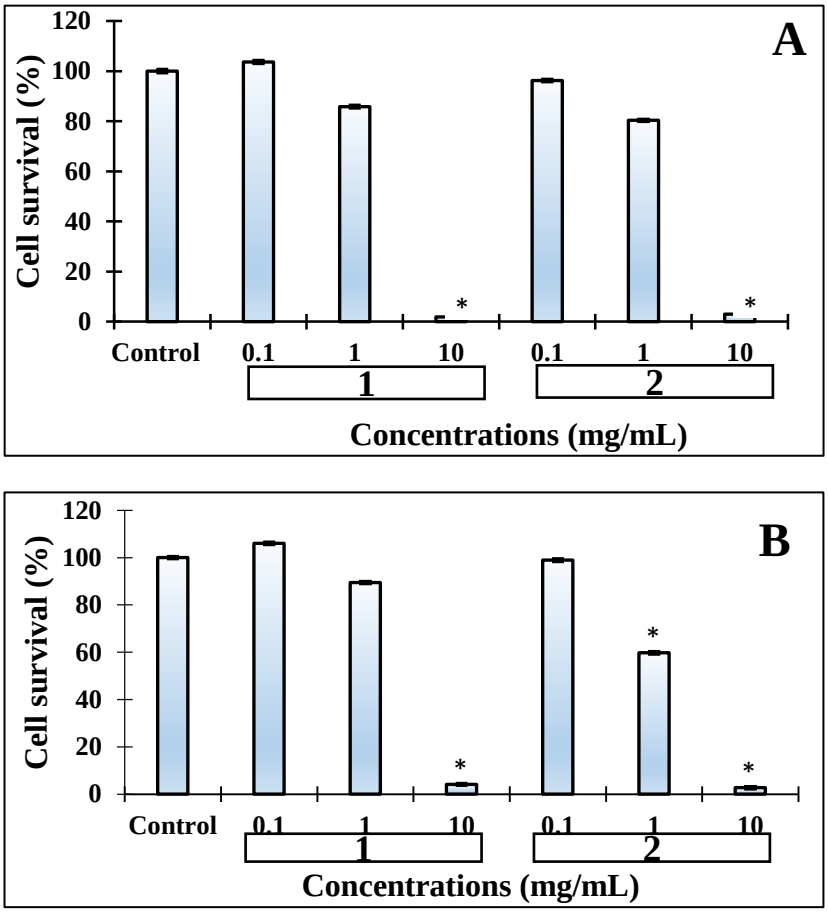
Les biosurfactants sont hautement appréciés pour leurs propriétés thérapeutiques polyvalentes, y compris leurs activités antibactériennes, antiadhésives, anti tumorales et anti-inflammatoires. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés, à évaluer l'activité anti tumorale du lipopeptide produit par la souche *B. safensis* F4.

Il faut rappeler que la souche bactérienne *Bacillus sp*.F4, isolée dans notre laboratoire, a été retenue pour son potentiel de production de biosurfactant sur milieu LB en présence de 1% huile d'olive. Cette production a été suivie en fonction du temps par la détermination du déplacement d'huile ainsi que l'index d'émulsification. Les résultats obtenus ont montré que le maximum de production est atteint après 24 heures de culture avec l'obtention d'un halo de déplacement d'huile de l'ordre de 21.08 ± 1.46 et un index d'émulsification de l'ordre de 74.99 ± 1.87. De plus, a été démontré que le biosurfactant est capable de réduire la tension de surface jusqu'à 30,73mN/m ± 0,48.

La concentration micellaire critique (CMC) du biosurfactant brut produit par *B. safensis* F4 est de l'ordre de 31.25mg/L. De plus, ce lipopeptide brut a montré une stabilité intéressante contre une large gamme de pH, température et salinité.

L'essai de cytotoxicité du biosurfactant brut et de la fraction d'acétonitrile a été réalisé contre des cellules de cancer du sein T47D et des cellules de mélanome de souris B16F10. La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant le test MTT.

Le test antitumoral préliminaire des échantillons a été réalisé à différentes concentrations (0,1, 1 et 10 mg/mL) pendant 48h. La figure ci-dessous montre que le biosurfactant brut et la fraction acétonitrile ont présenté des activités élevées contre les cellules T47D et B16F10 à 10 mg/mL ($p<0.001$). En outre, à la concentration de 1 mg/mL, la fraction acétonitrile était plus active contre les cellules B16F10 avec une survie de 59,75%, alors qu'à la concentration de 0,1 mg/mL, les deux échantillons testés ne présentaient aucune toxicité vis-à-vis des deux lignées cellulaires.



Essai anti-tumoral préliminaire du biosurfactant brut **(1)** et de la fraction d'acétonitrile**(2)** contre des cellules de cancer du sein T47D **(A)** et des cellules de mélanome de souris B16F10 **(B)**. *P* value calculée par le Test student.

Projet 4 : 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. 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.

L'évaluation de l'amplitude de la réponse cellulaire à l'exposition des cytokines a été faite par la quantification de l'expression du gène SLC26A4 ainsi que le dosage de la protéine MUC5AC par un test ELISA approprié. Les effets des trois siRNA sur le transcriptome ont été évalués par RNA Seq, ce qui a permis de confirmer la spécificité et l'efficacité de nos siRNA et d'identifier les principaux gènes et voies affectés par l'atténuation de notre cible thérapeutique SLC26A4 (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. (Responsable : Pr. S. MASMOUDI)

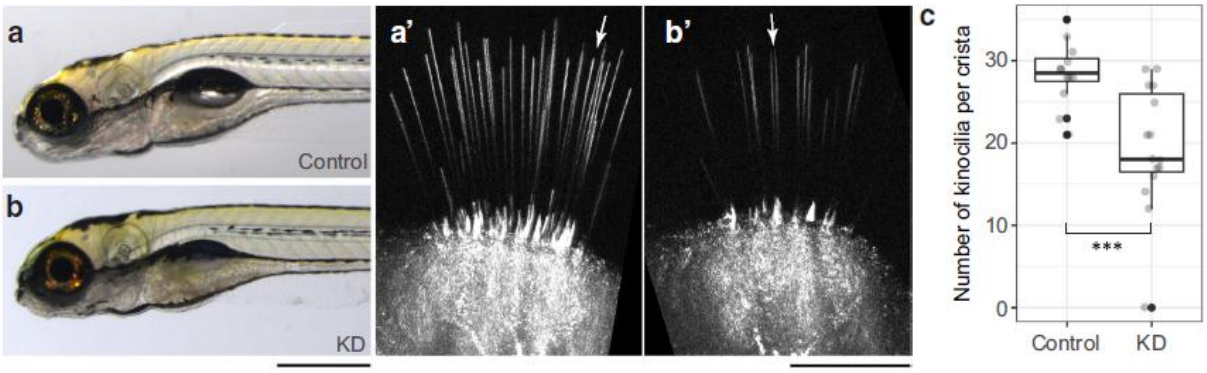
Biomarqueurs génomiques et épigénomiques de la surdité liée à l'âge :

Parmi les gènes sous-exprimés selon nos analyses transcriptomiques antérieures, *OTOS* a été précédemment sélectionné comme biomarqueur intéressant pour des analyses approfondies. L'année dernière, nous avons montré que ce gène est exprimé au niveau de l'oreille dans un organisme model, le poisson zèbre. Particulièrement, son expression commence à 120 heures après fertilisation et elle est maintenue jusqu'au stade adulte.

Ces observations suggèrent que ce gène pourrait jouer un rôle clé dans le développement des structures auditives. De plus, étant donné que son expression est maintenue dans l'oreille chez l'adulte, il est possible que ce gène soit aussi essentiel 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, une des manières des plus rapide consiste à sa répression par des expériences de réduction d'expression (knock down) en utilisant des oligonucléotides antisens de type « morpholinos » associé au rouge de phénol.

Ce dernier sert à visualiser le point d'injection et la diffusion des morpholinos. Les morpholinos ont été injectés dans des embryons de poisson zèbre au stade une cellule et ceci à une concentration de 100uM. Les observations morphologiques et phénotypiques de morphants n'ont montré aucun changement important de la structure corporelle mais dans certains embryons, la vessie natatoire n'était pas

gonflé (Figure ci-dessous). La forme de de l'oreille des embryons à 5 dpf était aussi normale. Néanmoins, un nombre réduit de kinocilia a été observé, indiquant que ce gène joue un rôle important dans la formation de kinocilium (Figure ci-dessous).



Effet de Morpholinos de l'otospiraline. (A) vue d'un contrôle non injecté et (B) un embryon injecté. Morphologie de la crista latérale : contrairement aux kinocilia (flèches) d'un témoin non injecté (A '), l'embryon KD (B ') a montré un nombre réduit de kinocilia. (C) Quantification du nombre de kinocilia montrant une réduction significative sur KD (n = 12 pour le contrôle et n = 15 pour KD; p = 0,000678)

Validation d'un kit de Séquençage haut débit HaloPlex^{HS} développé par le laboratoire:

Au cours de l'année 2019, nous avons établi de nouvelles collaborations directes avec des laboratoires spécialisés en diagnostic génétique, ou indirects avec des services cliniques à travers ces laboratoires. La mise en place d'une phase de preuve du concept par l'analyse par séquençage haut débit de quelques échantillons tests pour les différents membres de notre large consortium, nous a permis d'avoir 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.

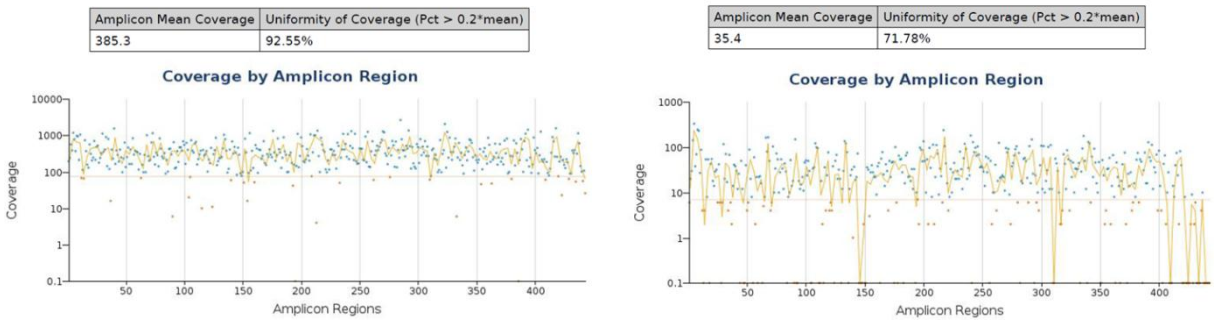
En effet, nous avons développé un deuxième kit de séquençage haut débit à façon HaloPlex^{HS} permettant le multiplexage de 48 échantillons. Nos analyses moléculaires par séquençage haut débit et bioinformatique d'ADNs extraits de patients atteints de différentes maladies héréditaires ont révélé une vingtaine de nouvelles mutations. 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. Par ailleurs, l'élargissement de notre réseau de recherche nous a permis de franchir les frontières et de viser des projets internationaux.

Dans ce cadre, un projet Européen de séquençage haut débit Twining a été récemment accepté. Ce projet sera une occasion pour soulever plusieurs défis que nous surmonterons en matière d'analyse des données et de validation des différents processus durant le prochain contrat programme.

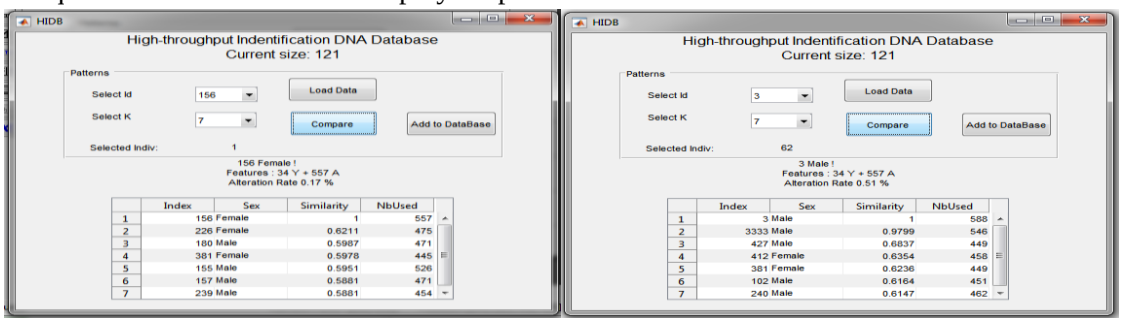
Projet 6 : Développement de kits pour l'authenticité moléculaire. (Responsable : Pr A. REBAI)

Au cours de ce projet, nous avons mis notre expertise dans les technologies du séquençage haut débit pour appuyer nos services de sécurités dans leurs efforts pour se mettre à niveau dans l'utilisation de ces technologies avancées d'identification et d'authentification de haute précision. Ainsi, dans le cadre d'un projet national fédéré pour la mise en place d'une banque de données biométriques multimodales de lutte contre le terrorisme, nous avons conçu l'amplification en parallèle de 443 fragments de taille allant de 125 à 190pb. Cet intervalle de taille est approprié pour amplifier même l'ADN dégradé. Pour l'ensemble de nos analyses, le séquençage massive d'ADN a montré un pourcentage de score de qualité >Q30 de l'ordre de 90% et une profondeur uniforme moyenne de plus de 100 lectures (Figure ci-dessous). Ceci confirme la réussite du protocole établi allant de l'extraction de l'ADN, passant par la préparation de la banque d'amplicons et enfin du séquençage massif parallèle.



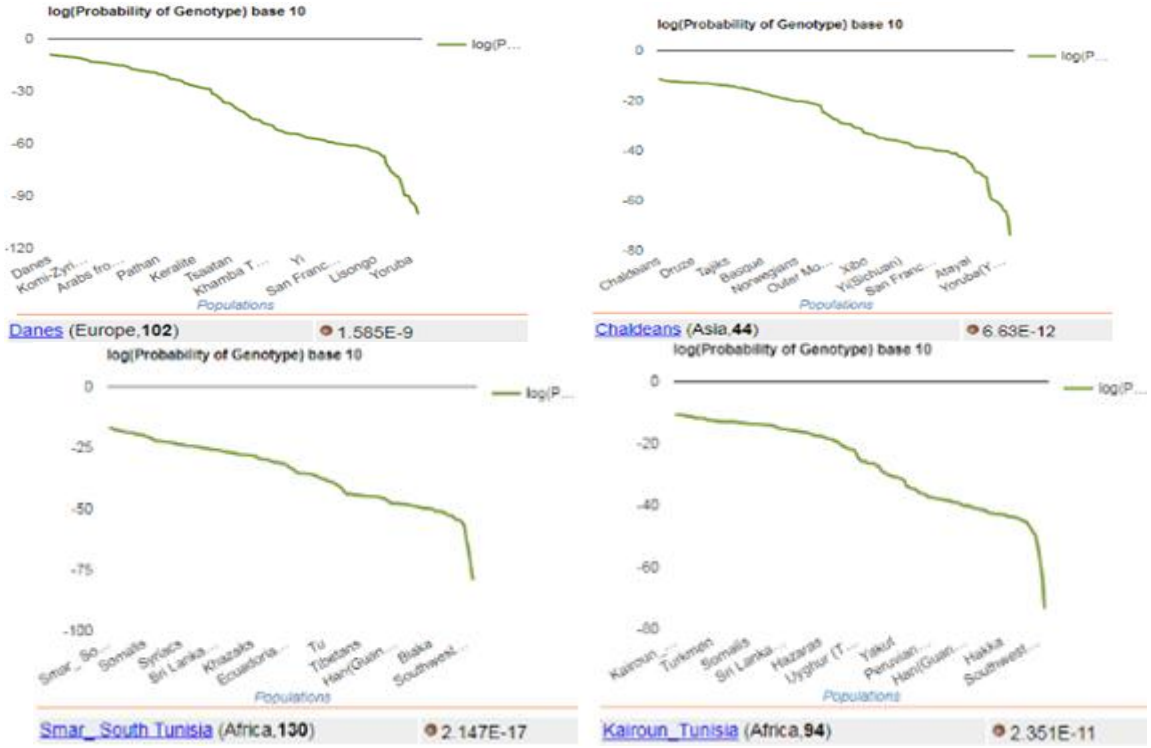
Profils de couverture de séquençage de deux ADNs de différentes qualités. L'ADN ayant le deuxième profil (à gauche) est exclu de la suite des analyses.

Au total, nous avons séquencés 167 ADNs différents (85 femmes et 82 hommes) extraits aussi bien de sangs que d'écouvillons buccaux. Lors de nos analyses, nous avons effectué des répliquas et nous avons inclus des ADNs contrôles pour la confirmation des résultats. Parmi les échantillons analysés, nous avons inclus trois ADNs de mauvaise qualité adressés au laboratoire par la Police Technique et Scientifique de Tunis. Ces ADNs ont été préanalysés au laboratoire de la police moyennant le génotypage classique des microsatellites (STRs autosomiques) et ont donné des profils partiels non interprétables. Le séquençage en masse pour l'ensemble des 443 amplicons a donné des informations de plusieurs centaines de marqueurs génétiques et a apporté des précisions phénotypiques invraisemblables.
Pour l'extraction des données et l'identification des individus, deux programmes ont été développés. Le programme de l'identification est réalisé sous Matlab (Figure ci-dessous). Il permet d'identifier le sex et l'identité de l'individu à partir de la base de données génotypiques que nous avons préparée L'analyse bioinformatique approfondie de nos données a montré que les 443 régions ciblées couvrent 611 marqueurs SNPs avec un taux de polymorphisme >1%.



Programme sous Matlab d'identification d'individus male (à gauche) et femelle (à droite)

La détermination de l'origine biogéographique a été réalisée en utilisant les bases de données Forensic Resource/Reference On genetics knowledge base (FROG-kb: http://frog.med.yale.edu). Nous avons inclus des individus non-tunisiens, une femme française et un homme originaire du moyen Orient (figure ci-dessous). La prédiction biogéographique à partir de l'ADN a confirmé leurs origines. Parmi, les tunisiens, l'origine a été confirmée dans 90% des cas.



Confirmation de l'origine biogéographiques de donneurs de la France (origine européenne), du Moyen Orient, de la Tunisie

TABLEAU RECAPITULATIF DES ACTIVITES

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

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Liste de Publications parues en 2019 (en gras chercheurs membres du laboratoire)

1- DiStefano MT, Hemphill SE, Oza AM, Siegert RK, Grant AR, Hughes MY, CushmanBJ, Azaiez H, Booth KT, Chapin A, Duzkale H, Matsunaga T, Shen J, Zhang W, Kenna M, Schimmenti LA, Tekin M, Rehm HL, Tayoun ANA, Amr SS; ClinGen Hearing Loss Clinical Domain Working Group (**Masmoudi S**). ClinGen expert clinical validity curation of 164 hearing loss gene-disease pairs. *Genet Med*. 2019; 21: 2239-2247.

2- Gibriel AA, Abou-Elew MH, **Masmoudi S**. Analysis of p.Gly12Valfs*2, p.Trp24* and p.Trp77Arg mutations in GJB2 and p.Arg81Gln variant in LRTOMT among non syndromic hearing loss Egyptian patients: implications for genetic diagnosis. *Mol Biol Rep.* 2019; 46: 2139-2145.

3- Choura M, **Rebaï A**, Hanin M. Proteome-wide analysis of protein disorder in Triticum aestivum and Hordeum vulgare. *Comput Biol Chem*. 2019: 107138.

4- **Kharrat N**, Assidi M, Abu-Elmagd M, Pushparaj PN, Alkhaldy A, Arfaoui L, Naseer MI, El Omri A, Messaoudi S, Buhmeida A, **Rebai A**. Data mining analysis of human gutmicrobiota links Fusobacterium spp. with colorectal cancer onset. *Bioinformation.* 201; 15 (6): 372-379.

5- **Triki H**, Charfi S, Bouzidi L, Ben Kridis W, Daoud J, Chaabane K,Sellami-Boudawara T, **Rebai A, Cherif B**. CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration. *Life Sci*. 2019 ; 231:116543.
6- **Ben Ayed R, Rebai A**. Tunisian Table Olive Oil Traceability and Quality Using SNP Genotyping and Bioinformatics Tools. *Biomed Res Int*. 2019; 2019:8291341.
7- **Ayadi M**, Martins V, **Ben Ayed R**, Jbir R, Feki M, Mzid R, Géros H, **Aifa S**, Hanana M. Genome Wide Identification, Molecular Characterization, and Gene Expression Analyses of Grapevine NHX Antiporters Suggest Their Involvement in Growth, Ripening, Seed Dormancy, and Stress Response. *Biochem Genet*. 2019 Jul 8.doi: 10.1007/s10528-019-09930-4.
8- **Ayadi M, Ben Ayed R**, Mzid R, **Aifa S**, Hanana M. Computational Approach for Structural Feature Determination of Grapevine NHX Antiporters. *Biomed Res Int*. 2019: 1031839. doi: 10.1155/2019/1031839.
9- **Elloumi-Mseddi J, Msalbi D,** Fakhfakh R, **Aifa S**. Anti-Diarrheal Drug Repositioning in Tumour Cell Cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*.2019;19: 1037-1047.
10- **Abdelli F, Jardak M, Elloumi J**, Stien D, Cherif S, **Mnif S, Aifa S**. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. Biodegradation. 2019 Aug;30(4):287-300.
11- **Moalla M, Hadj Kacem F**, Al-Mutery AF, Mahfood M, Mejdoub-Rekik N, Abid M, Mnif-Feki M, **Hadj Kacem H**. Nonstop mutation in the Kisspeptin 1 receptor (KISS1R)gene causes normosmic congenital hypogonadotropichypogonadism. *J Assist Repro Genet*. 2019; 36: 1273-1280.
12- **Cherif B, Triki H**, Sahnoun S, Hamden K, Sallemi A, Charfi S, Lassoued S. Imipenem toxicity in male reproductive organs as a result of inflammatory microenvironment and oxidative stress in germinal cells. Toxicology. 2019; 416:44-53. doi: 10.1016/j.tox.2019.02.001.
13- Pereira V, Freire-Aradas A, Ballard D, BÃ¸rsting C, Diez V, Pruszkowska-Przybylska P, Ribeiro J, Achakzai NM, Aliferi A, Bulbul O, Carceles MDP, **Triki-Fendri S, Rebai A**, Court DS, Morling N, Lareu MV, Carracedo Ã; EUROFORGEN-NoE Consortium, Phillips C. Development and validation of the EUROFORGEN NAME (North African and Middle Eastern) ancestry panel. *Forensic Sci Int Genet*. 2019; 42: 260-267.
14- **Kharrat N, Boumellasa R, Belmabrouk S, Benmarzoug R, Rebai A**. Charge clusters signatures in prokaryotic proteomes: Temperature-dependence and distribution. *Genomics*. 2019; 111(4): 863-868.
15- **Mnif S, Jardak M**, Graiet I, Abid S, **Driss D, Kharrat N.** The novel cationic cell-penetrating peptide PEP-NJSM is highly active against Staphylococcus epidermidis biofilm. *Int J Biol Macromol*. 2019; 125: 262-269.
16- **Choura, M., Rebaï, A**. The disordered charged biased proteins in the human diseasome. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*, 2019 12, 44–49.
17- **Ayadi, M., Mzid, R., Ben Ayed, R., Kharrat N**, Merchaoui H, **Rebaï, A**., Hanana, M. Genome-wide identification and molecular characterization of Citrus unshiu WRKY transcription factors in Satsuma mandarin: Clues for putative involvement in cell growth, fruit ripening, and stress response, 2019, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 43: 209-231.
18- Frauchiger DA, **Tekari A**, May RD, Džafo E, Chan SCW, Stoyanov J, Bertolo A, Zhang X, Guerrero J, Sakai D, Schol J, Grad S, Tryfonidou M, Benneker LM, Gantenbein B. Fluorescence-Activated Cell Sorting Is More Potent to Fish Intervertebral Disk Progenitor Cells Than Magnetic and Beads-Based Methods. *Tissue Eng Part C Methods*. 2019; 25(10):571-580.
19- May RD, Frauchiger DA, Albers CE, **Tekari A**, Benneker LM, Klenke FM, Hofstetter W, Gantenbein B. Application of Cytokines of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) Family in Spinal Fusion - Effects on the Bone, Intervertebral Disc and Mesenchymal Stromal Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019; 14: 618-643.
20- Kim T, Parale VG, Jung HN, Kim Y, Driss Z, **Driss D**, Bouabidi A, Euchy S, Park HH. Facile Synthesis of SnO2 Aerogel/Reduced GrapheneOxide Nanocomposites via in Situ Annealing for the Photocatalytic Degradation of Methyl Orange. *Nanomaterials* (Basel). 2019; 9(3). pii: E358.
21- Min-Hee Hong, Haryeong Choi, Younghun Kim, Taehee Kim, Hyung Hee Chob, **Dorra Driss**, Abdallah Bouabidi, Souhir Euchy, Hyung-Ho Park. Ti doping effects on the Seebeck coefficient and

electrical conductivity of mesoporous ZnO thin film. June 2019, *Materials Chemistry and Physics* 235:121757.

22- Feki-Sahnoun, W., Njah, H., Abdennadher, M., Hamza A, Barraj N, Mahfoudi M, **Rebai A**, Bel Hassen M. A Naïve Bayesian network approach to determine the potential drivers of the toxic dinoflagellate Coolia monotis (Meunier, 1919) in the Gulf of Gabès, Tunisia. *Euro-Mediterr J Environ Integr* 4, 30 (2019). https://doi.org/10.1007/s41207-019-0123-z

FORMATION DIPLOMANTE

I/ Habilitations soutenues

Najla Kharrat. Contribution de la bioinformatique à la recherche de bio marqueurs dans les maladies multifactorielles. Soutenue 9 février 2019

II/ Thèses de doctorat soutenues en 2019

1. .**Hela Gargouri**. Spéciation et authenticité génomique dans l'industrie agroalimentaire. Soutenue le 30 décembre, 2019. Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax.
2. **Amal Bouzid**. Biomarqueurs génomiques et épigénomiques des surdités de perception : identification pour des perspectives thérapeutiques. Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax. Soutenue 30 Avril 2019.
3. **Mariem Ayadi**. Identification, caractérisation moléculaire et analyse fonctionnelle des antiports NHX et des canaux chlorure CLC chez la vigne. Soutenue le 12 juin 2019. Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax.
4. **Nesrine Sghaier**. Méthodes et algorithmes pour la détection des motifs biologiques : application aux éléments de réponse à l'Auxine. Faculté des Sciences de Gabès, Soutenue Mars 2019.

III/ Mastères de recherche soutenus en 2018

1. **Ameni Chelly.** Recherche de marqueurs génétiques de performance et de risque de traumatismes sportifs et évaluation de leurs polymorphismes dans la population Tunisienne. Mastère en physiologie et biomécanique de l'activité physique, Institut Supérieur du Sport et de l'Education Physique de Sfax. Soutenue 20 Novembre 2019.
2. **Ines Henchi**. Etude des mécanismes d'inhibition de la formation des biofilms microbiens par des micro-organismes endophytes. Mastère de recherche en génomique/protéomique, Faculté des Sciences de Sfax. Soutenue 31 décembre 2019.

SEMINAIRES, JOURNEES ET ATELIERS SCIENTIFIQUES EN 2019

1. ESBM2019. 4th International conference of Engineering Sciences on Biology and Medicine. Faculté de Médecine de Sfax**, Octobre 2019**.
2. First ISN/Bro Tunisia based school of Neuroscience : from basic functions to neurodegeneratrive diseases. Faculté des Sciences de Sfax, **Nov 24-dec 1 2019**.

CONVENTIONS & PROJETS NATIONAUX D'OUVERTURE SUR L'ENVIRONNEMENT SOCIO-ECONOMIQUE

1. Projet **PRF** :'PBMLT': Plateforme Biométrique Multimodale de Prévention contre le Terrorisme', Budget (part du laboratoire) : 26.000 DT
2. Projet **PRF** : 'PARADIS': Plateforme Big Data pour les allergies alimentaires en Tunisie. Budget (part du laboratoire): 26.000 DT
3. **Projet Post-PFE** (Dr Meriem Ben Said), Budget: 22.000 DT
4. **Projet d'Encouragement des Jeunes Chercheurs** (Kharrat N, Mnif S, Driss D), Budget : 30.000 DT.

ROJETS DE COOPERATION INTERNATIONALE EN COURS OU ACCEPTES EN 2019

1 Projet dans le cadre de la coopération Tuniso-Indienne : Budget: 20.000D

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	Grades	Titulaires ou Contractuel
Ilem HASSAIRI	Ingénieur Général	Permanant
Adel ZITOUN	Ingénieur en chef	Permanant
Najoua AYEDI	Ingénieur en chef	Permanant
Imen REKIK	Assistant principal hors grade à l'application et à la recherche	Permanant
Nizar ELLEUCH	Assistant principal à l'application et à la recherche scientifique	Permanant
Faiçal BOUKHILI	Technicien	Permanant
Haitham MILADI	Agent technique	Permanant
Mohamed AMRI	Ouvrier	Permanant
Leila ELLOUZ	Ingénieur Principal	Contractuel

OBJECTIF GLOBAL

L'objectif général de l'Unité spécialisée (US) du CBS est de contribuer au développement des produits de la recherche du Centre et de valoriser, d'accompagner et d'engager une collaboration durable avec le monde socio-économique.

OBJECTIFS SPECIFIQUES

- 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 des divers Bioprocédés et Bioproduits;
- Contribuer au développement des projets de recherches / développement des différents laboratoires du CBS;
- Développer et Intégrer des bioprocédés et/ou produits innovants pour l'innovation de l'entreprises tunisiens;
- Assister les chercheurs dans la maîtrise et l'utilisation des différentes technologies et la production des divers bioproduits ;
- Produire à l'échelle pilote des grandes quantités des cellules ou des biomolécules par fermentation pour une éventuelle application industrielle.

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*** **:** Assistance et extrapolation à l'échelle pilote des travaux de recherche élaborés par les différents laboratoires du CBS

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

Dans le cadre du projet Européen CINEA 'Premier forum R21 de la recherche à l'industrie', qui concerne l'innovation de l'entreprise tunisienne, l'Unité spécialisée UVRR a proposé de travailler sur un

projet intitulé : 'Innovation de la chaine de transformation de Cactus' pour l'élaboration des bioprocédés et/ou de bioproduits à haute valeur ajouté'. Pour cela, un partenaire industriel tunisien (La Société NOPAL) fait partie dudit projet et a été mobilisé pour l'application, dans ses filières de productions, des produits et/ou procédés à valeurs ajoutées élaborés au sein de l'UVRR.

Le figuier de barbarie Opuntia ficus-indica est devenue l'espèce économique de cactus la plus importante dans le monde. En plus de ses valeurs alimentaires, il joue un rôle important dans l'industrialisation. Cette importance économique est due à l'immense valorisation qui peut être appliquée sur cette plante précieuse. Bien que les technologies de transformation de cactus aient fortement progressé, le traitement efficace et la valorisation des ressources de cactus présentent toujours un problème.

Ce projet concerne :

(i) le développement d'un procédé basé sur la technologie membranaire associée aux enzymes pour la clarification, l'enrichissement, l'amélioration ou l'élaboration de nouveaux produits de cactus ;

(ii) le développement d'un procédé fiable et reproductible basé sur la technologie enzymatique pour l'extraction des huiles de pépins de figue de barbarie afin d'améliorer la qualité des produits et des bioprocédés de transformation de Cactus.

L'activité 1 est structurée en trois actions principales :

Action 1 : Développement d'un procédé d'extraction des huiles de pépins de figue de barbarie

Cette action vise à intégrer une technologie innovante, un bioréacteur enzymatique, dans une filière de transformation de pépins de cactus afin (i) d'en améliorer la performance, (ii) de déterminer leurs composition en acides gras, leurs richesse en polyphénols et autres et (iii) de tester la stabilité d'un tel produit. L'objectif visé est de développer un procédé fiable et reproductible basé sur la technologie enzymatique pour l'extraction des huiles de très bonne qualité valorisable durablement à partir de farine de pépins et/ou de tourteaux extraite par presse à froid.

L'application sera recherchée sur des matières végétales livrées par la société NOPAL. L'extraction par presse à froid permet d'avoir une quantité d'huile de figue de barbarie inférieure à celle obtenue par solvant d'environ 30% à 50%. Cependant, la concentration des principes actifs (vitamine E, Stérols, Oméga 6) y est plus importante. Ce procédé délivre un coproduit dit tourteaux très riche en protéines (11-12%), en cellulose (30%), en molécules actives et riche en acide gras essentiels (0,7-1,2%), de ce fait sa valorisation devient nécessaire.

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. 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.

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.

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

Enzymes	Rendement d'extraction (%)	
	Tourteau de pépin	**Farine de pépin**
Enzyme [XCBS]	55	61.5
Enzyme [CCBS]	58.3	47.4
Enzyme [XL]	44	39.7
Enzyme [PL]	52.5	56.4
Enzyme [XCBS] + [CCBS]	57.5	79.5
Enzyme [XCBS] + [XL]	65	74.3
Enzyme [XCBS] + [PL]	63.5	78.2
Enzyme [CCBS] + [PL]	55	84.6
Enzyme [PL] + [XL]	52.5	80.7
[XCBS] + [CCBS] + [PL]	75	87
[XL] + [XCBS] + [PL]	91	91
Presse à froid	-	<75

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 graines (Tableau 1) alors qu'il varie entre 0,6 et 1,09 % pour le cas des tourteaux (Tableau 1) 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 1**).

Tableau 2. Composition de la fraction volatile des graines de figue de barbarie en fonction des combinaisons enzymatiques utilisées

Composés	TR (min)	Super press	Enzyme XCBS	Enzyme CCBS	Enzyme XL	Enzyme PL
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

Composés (%)	TR (min)	Enzymes PL+CCBS	Enzymes XCBS+ PL	Enzymes XL+ PL	Enzymes XCBS+CCBS	[XL] +[XCBS]+ [PL]
Acide Palmitique	11,9	21,87	34,71	47,91	24,12	20.5
Acide Linoléique	19,28	26,98	27,25	27,69	23,10	55.1
Acide Oléique	19,60	15,73	18,74	23,55	16,7	23.3
Acide Stéarique	21,06	3,78	5,09	3,09	5,12	3.31

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 et le tourteau de pépin, le meilleur taux d'extraction est obtenu lors de l'utilisation de la combinaison entre l'enzyme [CCBS], [XL] et l'enzyme [PL]. Le rendement d'extraction enregistré est de l'ordre de 91 %. L'huile obtenue par extraction enzymatique a présenté une activité anti radicalaire par le DPPH alors que celle obtenue par presse à froid ne possède aucune activité anti radicalaire. Toutefois, l'identification des acides gras extraits a montré que 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% (**Tableau 2**).

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 1). 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. Le pourcentage maximal d'inhibition est atteint à 100 µg/ml. De même, on a montré que les deux extraits obtenus par extraction enzymatique ont montré leurs richesses en Vitamine E (10.7 µg/ml) et en Beta carotène (4.54 µg/ml) **(Tableau 3**, **Fig 2 et 3**).

Tableau 3. Composition d'extrait enzymatique d'huile en vitamine A et vitamine E

Vitamines	TR (min)	Quantité µg/ml
Alpha tocophérol (vit E)	13.919	10,7
Beta carotène (vit A)	10,551	4.54

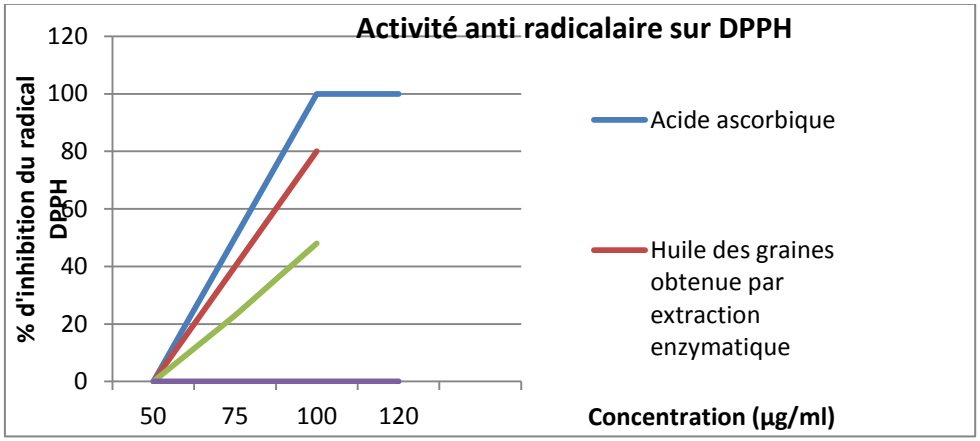


Figure 1 : Evaluation de l'activité anti radicalaire des fractions huileuses obtenues par extraction enzymatique

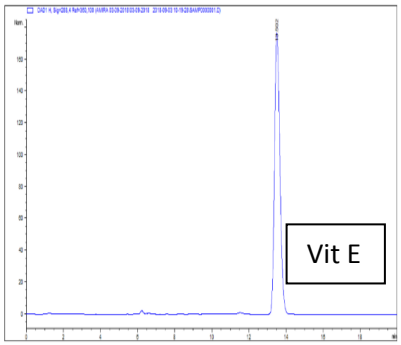


Figure 2. Identification de vitamine E par HPLC **Figure 3.** *Identification de vit A par HPLC*

Action 2 : développement d'un procédé fiable et reproductible basé sur la technologie enzymatique pour l'extraction des huiles de pépins de figue de barbarie afin d'améliorer la qualité des produits et des bioprocédés de transformation de Cactus.

L'objectif de cette action est de développer un procédé hybride de transformation de la pulpe de figue de barbarie, basé sur la technologie membranaire associée aux enzymes, pour la clarification et l'élaboration des nouveaux produits tout en améliorant la qualité des produits et les performances des procédés existantes. La transformation industrielle de la pulpe de cactus est limitée par le traitement de la pulpe et par la thermosensibilité de son arôme. La liquéfaction enzymatique de la pulpe peut apporter une solution en facilitant le traitement membranaire par microfiltration tangentielle et en enrichissant sa composition en fibre et en vitamine tout en augmentant sa stabilité. La méthodologie adoptée est organisée en 2 phases :

- Phase 1 : Liquéfaction enzymatique

- Phase 2 : Application des procédés membranaire de clarification du jus de pulpe en aval du procédé d'hydrolyse enzymatique.

Le flux de filtration est l'un des paramètres les plus importants dans l'évaluation des performances d'un procédé de filtration tangentielle. Dans cette partie, nous allons présenter et discuter les résultats de nos essais de filtration membranaire de la pulpe brute en termes d'évolution du flux de filtration en fonction du temps et en fonction des conditions opératoires.

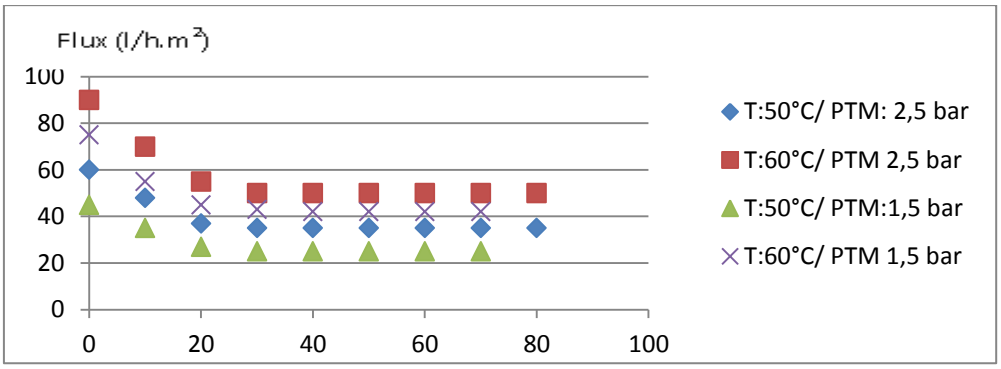


Figure 4 : Variation du flux de filtration en fonction du temps et des conditions opératoires testées

Les essais préliminaires de clarification du pulpe fraiche de la figue de barbarie sont réalisés à l'UVRR sous une température variable allant à 60°C et une pression transmembranaire de 1.5 et 2.5 bar en utilisant une membrane en céramique de 0.2µm.

Le flux de filtration a été réduit de 45 % après 30 min de fonctionnement et s'est stabilisé autour de 50 l/h.m^{2}lors de l'utilisation d'une température de 60°C et une pression de 2 5 bar (**Figure 4**). Ceci est dû à la formation d'une couche de polarisation de concentration qui est susceptible d'engendrer une pression osmotique; ce qui réduit le flux de perméat jusqu'à ce qu'il atteint l'état équilibré. Par Contre, les valeurs des flux de filtration obtenues relatives à la pression transmembranaire 1.5 bar et à une température de 50°C sont inférieures à ceux obtenus lors de l'application des pressions transmembranaires de 2.5 bar et des températures élevée de l'ordre de 60°C. Les solides en suspension généralement responsables de cet encrassement sont les polysaccharides provenant des parois cellulaires des fruits, tels que les pectines insolubles, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine.

La concentration élevée de ces macromolécules à la surface de la membrane produit une couche dynamique qui, dans certains cas, forme une couche imperméable semblable à un gel. Il est possible de limiter l'encrassement de la membrane dans un système de microfiltration par l'intégration d'un système de dé colmatage et /ou un système de prétraitement enzymatique de la pulpe. Ainsi, l'ajout des réactions d'hydrolyse enzymatiques (les pectinases et les cellulases etc.) parait nécessaire. Même, si la liquéfaction complète du solides n'est jamais réalisée. Il est à noter que la clarification de la pulpe s'est traduite par l'obtention d'un jus clair, translucide et d'une couleur jaunâtre.

La liquéfaction enzymatique a été conduite par utilisation de plusieurs enzymes sur deux lots de pulpe fraiche de figue de barbarie caractérisées par une teneur en matière solides variable. L'analyse des résultats obtenus a montré que le pourcentage de liquéfaction des solides solubles varie entre 30 et 70 %, pour les pulpes selon le type d'enzyme utilisée.

En effet, l'utilisation des enzymes combinés [pectinase + cellulase] donne la meilleure valeur de liquéfaction (70 %). L'utilisation de l'enzyme [pectinase] seule et l'enzyme [cellulase] seule donnent des valeurs inférieures du taux de liquéfaction des matières solides, soient 44 % et 23%, respectivement, pour la même activité (180u/ml) (0.1%). Par ailleurs, l'utilisation de concentrations d'enzymes supérieures à 350 U/ml n'a pas montré une amélioration significative. Il est à noter 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. Un excellent rendement est atteint rapidement à 50°C (au bout de 1 heure 30 min).

Les jus pulpeux utilisés dans cette étude étaient caractérisés par une teneur en solides solubles entre (10 et 20 %) avant traitement enzymatique. Le pH du jus a été maintenu à son pH naturel (6.5).

A la fin du traitement enzymatique, l'enzyme de l'échantillon a été inactivée en chauffant le jus à

90 °C pendant 5 min. Le surnageant des pulpes traités a été évalué pour son enrichissement en degré brix et sa clarté. La clarté est déterminée en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 453 nm. La cinétique de la liquéfaction enzymatique a été suivie par la diminution de la teneur en solide soluble dans le jus et l'augmentation de la teneur en matière soluble dans le surnagent. La concentration en enzyme était le facteur le plus important ayant une incidence sur les caractéristiques du jus de figue, car celui-ci exerçait une influence très significative sur la clarté du produit et son enrichissement en matières organiques solubles. Une augmentation du temps de traitement et / ou de la concentration du traitement enzymatique était associée à une augmentation de la transparence et à une diminution de la turbidité. On a également observé sur la figure 3, que la matière sèche du surnagent (exprimée en degré brix) augmentait avec la concentration d'enzyme utilisée.

Cependant, on a montré qu'une augmentation du temps de traitement au delà d'1h 30 min et / ou de la concentration des deux enzymes au delà de 0.1% n'était pas associée à une augmentation du degré brix du jus de barbarie traité avec différentes concentrations des enzymes. Après au minimum 1 heure d'incubation à 50 °C, la diminution de la teneur en solides solubles a atteint 70 % de la valeur initiale (**Figure 3**). Cependant, l'effet de l'enzyme de liquéfaction dépend de la composition des polysaccharides de la matière solide des pulpes. Même après un traitement enzymatique intense avec des pectinases et des cellulases agissant en synergie, une proportion importante de polysaccharides de la pulpe résiste toujours à l'attaque enzymatique. Ces solides solubles résistants aux enzymes s'accumulent dans le rétentat, ce qui à augmenté l'encrassement de la membrane et la diminution du flux de filtration. Atteindre un FCV élevé et maintenir le débit de perméat au-dessus des valeurs critiques constitue une contrainte sérieuse à l'application de la microfiltration à des jus pulpeux à une échelle industrielle (**Figure 4**). En effet, à des fins industrielles, le FCV est directement lié au rendement de l'opération et constitue un indicateur essentiel de la viabilité de la microfiltration. FCV est élevé, plus le rétentat riche en matière non solubilisé est volumineux, plus le rendement de l'opération membranaire est faible.

L'intégration des opérations de liquéfaction en amont de l'étape de la séparation membranaire était imposée non seulement par le système et les conditions opératoires de la séparation membranaire (colmatage par les fibres ou/et la matière colloïdales, FCV faible,..) mais aussi par la qualité et la stabilité du produit. En effet, l'entichement du produit en matière soluble augmente son bilan énergétique, sa stabilité et son arôme. L'efficacité du procédé de séparation a été évaluée par les bilans matière et énergétique, la stabilité et la qualité du produit. Les techniques de dé colmatage des membranes et la possibilité d'associés la liquéfaction enzymatique en amont aux procédés membranaires ont pu améliorer nettement le flux de filtration (**Figure 5**).Ainsi, les conditions opératoires dégagées pour clarifier et enrichir le jus de figue de barbarie en matière solides solubles étaient une concentration en enzyme de 0,1%, une température d'incubation de 50 ° C, une durée d'incubation de 1h30 min, une vitesse de circulation de 3m/s et un PTM de 2 bar.

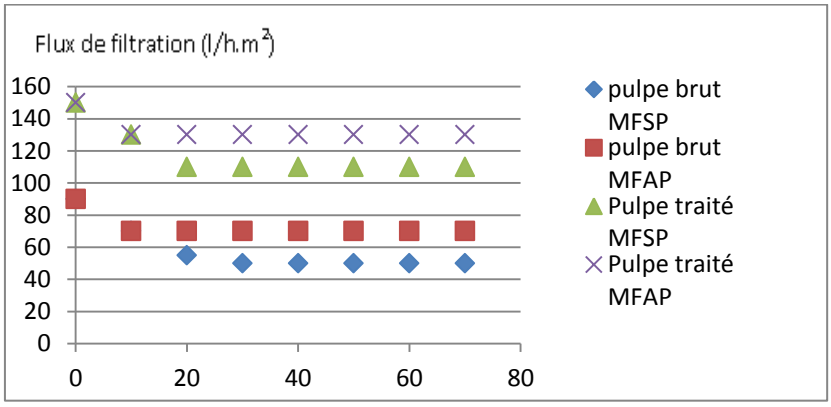


Figure 5. Evolution du flux de filtration en fonction du temps et du produit ; MFSP : microfiltré sans application du système de dé colmatage ; MFAP : microfiltré avec application du système de dé colmatage back pulse à une fréquence de 10s

La variation du flux de microfiltrat en fonction du temps (**Figure 5**) montre que le flux de filtration a été réduit de l'ordre de 50% après 30 minutes de filtration pour le jus brut alors qu'il était seulement de 27% pour le jus traité par les enzymes. Le flux initial était de 90 $l.h^{-1}m^{-2}$ et de 150 $l.h^{-1}m^{-2}$

respectivement pour le jus brut et le jus traité par les enzymes ont diminué et ont tendance à se stabiliser autour de 50 $l.h^{-1}m^{-2}$ et 110 $l.h^{-1}m^{-2}$ respectivement et ceci sans application de système de décolmatage.

L'état d'équilibre obtenu montre que l'encrassement externe se produit progressivement. Ceci suggère une hétérogénéité importante des macromolécules (pectine, cellulose, hémicellulose ...) qui participent à l'établissement de l'encrassement. Des flux stabilisés similaires (41 $l.h^{-1}m^{-2}$) ont été observés par Chamchong et Noomhorm avec une membrane de 0,2 µm de diamètre nominal des pores pour la clarification du jus de fruits de la mandarine. Il est à noter, que l'application d'un système de dé colmatage (back pulse) et le traitement enzymatique au produit brut ont amélioré nettement le flux de filtration. L'augmentation du flux de perméat peut atteindre 2.6 fois par rapport au flux obtenu en débit continu sans traitement et sans application d'un système de décolmatage.

L'efficacité du procédé de séparation a été évaluée par les bilans matière et énergétique, la stabilité et la qualité du produit. Les paramètres de coloration ont été étudiés pour le jus de figue de Barbarie cru et microfiltré. Le jus obtenu a une couleur jaune orangé qui rend le produit naturel attrayant pour les consommateurs ayant un goût aigre-doux agréable.

<u>Activité 2:</u> 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. Au niveau de l'unité spécialisée (UVRR), un programme de recherche-développement portant sur la valorisation technologique et le transfert des antioxydants dans des produits alimentaires est développé à l'échelle pilote en collaboration avec le Laboratoire LBPE visant la mise au point d'un procédé d'extraction d'antioxydants à partir de plantes végétales.

Cette activité a pour objectif d'introduire des biomolécules à haute valeur ajoutée (les antioxydants) dans la gamme de produits GIPA riches en matières grasses. L'application et l'optimisation de la quantifié des biomolécules et l'évaluation rapide de la stabilité des produits vont nous permettre de redéfinir les faisabilités techniques et économiques et de prolonger la date limite de consommation des produits ainsi que leur stabilité et leur richesse en molécules à haute valeur nutritionnelle.

L'évaluation du potentiel antioxydant dans l'aliment est réalisée 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. Cette étude est également complétée par des analyses bactériologiques afin de montrer l'efficacité des extraits dans la décontamination microbienne des produits. Les résultats d'optimisation des concentrations des biomolécules incorporées dans la gamme des produits YAB et l'évaluation de leurs activités restent confidentiels

<u>Activité 3:</u> Assistance et extrapolation à l'échelle pilote des travaux de recherche élaborés par les différents laboratoires du CBS

Cette activité a pour objectif principal de prendre en charge les expérimentations de scale-up à l'échelle pilote des projets de recherche élaborés par les différents laboratoires du CBS. Ainsi, des prestations de service et assistance des chercheurs du CBS et autres sont offertes par l'UVRR et qui concernent la production par fermentation, la formulation par les opérations unitaires et des essais.

L'activité 3 est articulée sur deux principales actions :

<u>Action 1</u> : Développement d'un procédé économique de production de protéases et de lipases

Cette action a pour objectif principal de développer à l'échelle pilote un procédé fiable et reproductible pour la production en fermenteur et la formulation de quantités importantes d'enzymes moyennant des techniques de microbiologie et d'opérations unitaires pour le traitement des peaux ovines. Ce projet est réalisé en collaboration entre l'UVRR et le laboratoire LBMIE du CBS et leur partenaire industrielle (la société SO. Et. Cuir) et académique (l'ENIS et CNCC) pour son développement et ce dans le cadre de projet PNRI-KER-LIP 2017-2018) portant sur le développement et optimisation d'un procédé éco-innovant de traitement des peaux ovines : reverdissage, épilage-pelanage et dégraissage enzymatiques.

Les conditions de culture et de la production des enzymes dans un fermenteur de capacité 100 litres sont optimisées et la faisabilité technologique de ce projet est étudiée. La production de quantités importantes

d'enzymes (des centaines de litres) en fermenteur de capacité totale 100 Litres est réalisée dans les conditions optimisées et transférée au monde socio-économique afin de pouvoir les tester dans les deux domaines de la détergence et de la tannerie. Il est à noter, que cette action a été réalisée en étroite collaboration avec les membres du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des enzymes du CBS (LBMIE).

Action 2 : Prestations de services

Dans le cadre de l'action 3 des prestations de services sont assurés aux différents laboratoires du CBS, aussi bien qu'au monde académique et socio-économique à savoir :

2.1. Prestation de services pour les différents laboratoires du CBS durant l'an 2019

L'unité spécialisée (UVRR) a assuré entre autre une assistance technique aux différents laboratoires du CBS dans la réalisation d'expérimentations de fermentation, de séparation et d'analyses. L'objectif est d'assister les chercheurs dans la maîtrise et l'utilisation des différentes technologies nécessaires à la réalisation de leurs projets de recherche et développement. Le tableau 4 présente les principaux travaux de prestation de services (fermentations, de formulations et d'essais) réalisés pour le compte des laboratoires du CBS l'an 2019.

Tableau 5. Prestations de services : fermentation, séparation, concentration, séchage et autres, réalisées au l'an 2019 pour le compte des laboratoires du CBS.

Laboratoires	Séparation/ concentration	Broyage/ séchage	Fermentation	Analyses
LBMIE	10	03	12	-
LBPE	10	02	01	145
LMB	-	04	01	6
LB Pest	07	08	-	03
LBME	03	01	05	02
LPCMC	00	02	-	-

2.2 Prestation de services pour les différentes autres structures de recherche et le tissu socio-économique

L'unité spécialisée (UVRR) a assuré également une assistance technique aux établissements publics et au tissu socio-économique (industriels) dans la réalisation d'analyses et d'opérations unitaires avec participation à la résolution de certaines contraintes rencontrées dont leurs activités.

Citons par exemple:

- Séchage par lyophilisation ;
- Analyse biochimique

Les principales prestations de service réalisées, dans le cadre de cette thématique, pour le compte des organismes nationaux à savoir le centre de recherche et des technologies d'énergies et le monde socio-économique (CRTEn) à savoir AGROMED et la société HAZEM sont les suivants

- Réalisation de 2 cycles de lyophilisations des extraits végétales pour le compte du centre de recherche et des technologies d'énergies et le (CRTEn).
- Analyses biochimiques et microbiologiques à savoir la détection des activités enzymatiques et le dénombrement des germes et ce. pour le compte de la société AGROMED.
- La caractérisation biochimique des articles de la gamme des produits de la société HAZEM.

Partenariat avec le monde académique et industriel

L'unité spécialisée (UVRR) a réussi d'établir des partenariats avec le monde académique et industriels**.**

- Convention payante, signée le 15 novembre 2019 avec la société « HAZEM » portant sur l'application des techniques d'analyses physicochimiques, biochimiques et/ou microbiologiques pour la caractérisation de certains produits commercialisés par ces entreprises. Durée : 1 an ;
- Partenaire au projet PRF 2019-D1P1 portant sur la Valorisation de souches halophiles dans la production de nouvelles biomolécules antioxydants : évaluation des performances protectrices et stabilisatrices dans la formulation de nouvelles crèmes antisolaires en vue de promouvoir le secteur des bio-cosmétiques en Tunisie (VASBA). Durée : 3 ans.

Service d'Analyse

LISTE DES MEMBRES DU SERVICE ANALYSES :

Nom et prénom	Grades[1]/Spécialité
Aïda HMIDA-SAYARI	Maître de conférences/ Génie Biologique
Najla Masmoudi-Fourati	Ingénieur principal/Agroalimentaire
Lobna JLAIEL	Technicienne principale / Chimie
Kamel Walha	Technicien principal / Chimie
Nesrine Kchaou	Technicienne principale / Agroalimentaire/ chimie industrielle
Emna Sahli	Ingénieur (Contractuelle)/Biologie Industrielle

OBJECTIFS GENERAUX DU SERVICE ANALYSES :

- Appui aux laboratoires de recherche pour la réalisation de leurs projets.
- Appui aux chercheurs d'autres universités/prestations de services
- Offre de services aux industriels en analyse chimique et en séquençage génomique
- Etablissement des conventions de recherche avec le monde socioéconomique
- Accréditation des analyses réalisées par les différentes plateformes de l'Unité

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

Le service d'analyse du CBS est doté de compétences qualifiés en analyse « Ingénieurs et techniciens » et d'équipements de pointes qui leur permettent de réaliser des analyses aux profits des chercheurs du CBS, des universitaires et des industriels.
Les différents types d'analyses effectués sont :

- Dosage quantitatif des sucres par HPLC : Polysaccharides, Monosaccharides ou sucres simples.
- Analyse quantitative des acides gras volatils (AGV) par CPG
- Analyse quantitative et qualitative des alcools et des solvants organiques par CPG.
- Analyse quantitative des phénols simples par HPLC.
- Analyse des acides gras à longues chaînes par HPLC.
- Séparation et purification des protéines et de certaines molécules actives par FPLC et HPLC.
- Analyse qualitative de composés en très faibles proportions dans un mélange par spectrométrie de masse.
- Détermination de la masse exacte de certaines molécules pures par LC/MSMS
- 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.
- Imagerie cellulaire par Microscope confocal et Cytomètrie en flux
- Quantification des acides nucléiques par spectrométrie dans l'UV (Nanodrop) et par fluorométrie (Qubit)
- Extraction automatisé des acides nucléiques à partir de tissu animal, tissu végétal et de microoraganismes
- Electrophorèse automatisée des acides nucléiques (Bioanalyzer)
- Amplification des acides nucléiques par PCR en temps réel (QPCR)

PLATEFORMES DU SERVICE ANALYSES

Le service d'analyse dispose d'une large gamme de techniques analytiques très modernes assurées par des appareils performants, installés dans des locaux parfaitement adaptés à leur bonne exploitation, celle-ci étant assurée par un personnel dynamique et qualifié. Ces appareils permettent d'effectuer des analyses complexes avec un degré élevé de précision et de reproductibilité :

Nature de l'équipement utilisable		DATE D'ACQUISITION
Plateforme « Chromatographie et Spectrométrie de masse»	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse **LC/MS/MS**	2003
	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse **GC/MS**	2006
	Hplc series 1100 agilent technologies	2006
	Hplc series 1260 agilent technologies DAD/RID	2013
	FPLC biorad	1997
	HPLC préparative	2006
	HPLC ionique	2009
Plateforme Génomique	Fluorimètre (Qubit)	2016
	Electrophorèse automatisée	2015
	Lecteur de plaques photométrique/Fluorimétrique	2015
	Séquenceur haut débit Miseq Illumina	2014
	QPCR en temps réel cfx96	2015
	spectrophotomètre UV/vis pour micro volume Nanodrop 2000 (x2)	2013
	Séquenceur 4 capillaires applied biosystems	2004
	Extracteur automatique d'acides nucléiques	2018
Plateforme d'Imagerie et de cytomètrie en flux	Un microscope confocal	2006
	Cytomètre en flux	2017
	Un microscope à fluorescence (Olympus BX51)	

ACTIVITES DU SERVICE ANALYSES

Les activités du Service Analyses sont:

Activité 1 : Analyses chromatographiques par HPLC, FPLC et HPLC ionique

Il s'agit de l'analyse, l'identification, la quantification et la purification des substances ayant une ou plusieurs activités biologiques telles-que les protéines, les enzymes, les peptides, les toxines et autres

molécules bioactives. Ces travaux répondent à de nombreux besoins dans des domaines aussi différents couvrants l'industrie pharmaceutique, para-pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, textile, détergence ainsi que des domaines se rapportant à l'alimentation animale, la production des biocomposites, la production des biopesticides et des antimicrobiens, etc ...

Activité 2 : Analyses chromatographiques par GC/MS et LC/MS/MS

Actuellement les principales analyses effectuées sont :

- Détermination de la composition des huiles essentielles dans différents extraits par GC-MS.
- Détermination des pesticides, hydrocarbures, stérols, tocophérols .. par GC-MS.
- Analyse des acides gras dans les produits alimentaires par GC-FID.

Activité 3: Analyse Génomique

- Extraction, quantification, électrophorèse des acides nucléiques
- Amplification en temps réel par PCR Q
- Séquençage automatique des acides nucléiques, Plasmide, fragments PCR
- Séquençage haut débit : exomes, génomes bactéries et champignons, ADN 16S de métagénome.

Activité 4 : Imagerie cellulaire et cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet l'analyse qualitative et quantitative, basée sur la taille, la granulosité et l'intensité de fluorescence d'éléments en suspension. Ces éléments peuvent être des cellules, des bactéries, des levures, mais aussi des constituants subcellulaires: noyaux, mitochondries, etc.

Les analyses effectuées par le sevice analyses sont principalement :

- Evaluation du cycle cellulaire de cellules marquées à l'iodure de propidium
- Suivi de la viabilité cellulaire/Apoptose
- Identification des microalgues dans un consortium/ marquage des bactéries par Syber Green
- Etude de l'abondance des bactéries hétérotrophes dans l'eau de mer

INVENTAIRE DES ANALYSES EFFECTUEES AU SEIN DU SERVICE ANALYSES AU PROFIT DES DIFFERENTES STRUCTURES DE RECHERCHES DU CBS POUR L'ANNÉE 2019

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 2019
GC/MS	90
HPLC	273
FPLC	19
Cytomètre en flux	6
SEQUENCEUR MISEQ	18 RUNS
QPCR	273
BIOANALYSEUR	82
VARIOSKAN	69

INVENTAIRE DES ANALYSES EFFECTUEES AU SEIN DU SERVICE ANALYSES SOUS FORME DE PRESTATION DE SERVICE

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

Les bénéficiaires de ces prestations sont regroupés dans **le tableau 2**.

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

Bénéficiaire	**Type d'analyse**	**Nombre d'analyses**
SIMED PHILADELPHIA	HPLC	108
Centre régional de Recherches en Agricultures Oasisiennes (DGECH)	GC/MS	6
ENIS	GC/MS	4
Université de Souk Ahras Algérie, Soumaya boukerch	GC/MS	12
Société Hazem	GC/MS HPLC	1 2
Société AGRITEX	HPLC	3
SOFAP (Groupe Hammami)	GC/MS	1
TOTAL = 137		

CONCLUSION

Le Service Analyses du CBS continuera à :

- Subvenir aux besoins exprimés par les labos du CBS, les universitaires et les industriels
- Mettre à la disposition des chercheurs du CBS et autres des moyens analytiques de haut niveau, pour leur permettre de développer des travaux de recherche de grande qualité scientifique
- Epauler les industriels pour les aider à améliorer la qualité de leurs produit pour parvenir à réaliser ses objectifs, le service analyses doit :
- S'organiser selon les instructions de l'accréditation ISO 17025 en collaboration avec l'unité spécialisée ''Qualité''
- Récolter des normes indispensables à la réalisation des prestations de services
- Etablir des protocoles d'analyses personnalisés selon les besoins du demandeur
- Renforcer les compétences en ressources humaines de l'unité via des formations continues et des stages à l'étranger
- Effectuer une maintenance, réparation et achat de pièces de rechange pour l'appareillage existant
- Acheter de nouveaux appareils afin d'augmenter le potentiel analytique de l'unité et promouvoir davantage ses prestations et ses activités de recherche.