



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département :** Biologie et Ecologie Végétale

**قسم :** بيولوجيا و ايكولوجيا النباتات

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** *Biologie et Génomique Végétales*

Intitulé :

---

# La voie de signalisation « Myc » : création d'une base de données du gène *dmi3*

---

**Présenté et soutenu par :** *Mlle. BENDAIRA Zineb*

**Le :** 16/06/2016

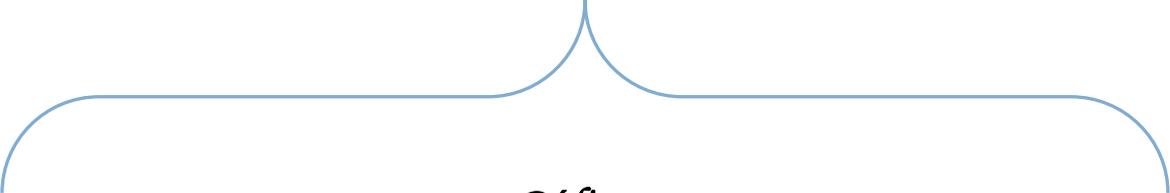
**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** *KELLOU Kamel* (M.A.A - UFM Constantine).

**Encadrante :** *BENABDOUN Faiza Meriem* (M.C.B - UFM Constantine).

**Examineur :** *HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid* (Professeur - UFM Constantine).

*Année universitaire  
2015 - 2016*



## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes parents :*

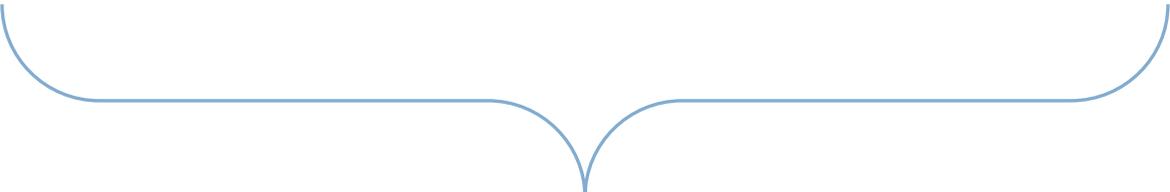
*Ma mère **BOUDCHICHA Rdjia**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père **BENDAIRA Hocine**, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mes frères (**Khaled, Omar, et Othmen**) et ma sœur **Fatma Zohra** qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Mes amies **Marwa, Amira, Hadjer, Imene, Amina, Hawa, Rjma** de par le monde qui n'ont cessé de m'encourager.*

*Mes tantes, oncles, cousins et cousines, neveux et nièces.*



## **Remerciements**

*Je tiens à remercier **DIEU**, pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer ce mémoire.*

*Je tiens à remercier mon encadrante **Dr. BENABDOUN Faiza Meriem**, pour ses précieux conseils et l'orientation du travail durant toute sa réalisation.*

*Mes plus vifs remerciements vont également aux membres du jury :*

*A monsieur le président du jury **KELLOU Kamel**, et à **Mr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid** pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant d'examiner mon travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Mes remerciements vont également à tous les enseignants durant les années d'études.*

*Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.*

*Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Résumé :

On estime que plus de 80% des végétaux interagissent avec des champignons. Cette association symbiotique apporte à la plante des éléments nutritifs, essentiellement le phosphore, utile à sa croissance, et d'autre part, renforce ses défenses naturelles vis-à-vis de stress d'origine biotique ou abiotique. L'interaction débute par un échange de signaux entre les deux partenaires où les molécules symbiotiques clefs sont des « strigolactones » sécrétées par le partenaire végétal, et des « facteurs Myc » produits par le champignon. La reconnaissance de ces signaux moléculaires déclenche une cascade de signalisation dans les cellules racinaires qui implique plusieurs gènes aboutissant à la mycorhization. Parmi ces gènes, on cite *dmi3/ccamk* codant une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline. L'objectif de notre travail est de créer une base de données du gène *dmi3* contenant toutes les informations concernant ce gène chez différentes espèces appartenant à différentes familles. Les résultats montrent que le gène *dmi3* diffère d'une espèce à une autre et même au sein de la même famille.

**Mots clés :** mycorhization, facteurs « Myc », signaux moléculaires, *dmi3*, base de données.

**Summary :**

It is estimated that over 80% of the plant interact with fungi. This symbiotic partnership provides plant nutrients, mainly phosphorus, useful for its growth, and on the other hand, strengthens its natural defenses vis-à-vis stress of biotic or abiotic origin. The interaction begins with an exchange of signals between the two partners where the symbiotic key molecules are "strigolactones" secreted by the plant partner, and "Myc factors" produced by the fungus. Recognition of these molecular signals triggers a signaling cascade in the root cells which involves several genes leading to mycorrhiza. Among these genes, mention *dmi3/ccamk* encoding a protein kinase dependent calcium and calmodulin. The objective of our work is to create a database of *dmi3* gene containing all the information regarding this gene in different species belonging to different families. The results show that the gene *dmi3* differs from one species to another and even within the same family.

**Keywords:** mycorrhization, factors "Myc", molecular signals, *dmi3*, database.

## ملخص :

تشير الإحصائيات إلى أن أكثر من 80 ٪ من النباتات تتفاعل مع الفطريات. وتوفر هذه الشراكة التكافلية المغذيات النباتية، وخاصة الفوسفور المفيدة لنموها، ومن ناحية أخرى، تعزز الدفاعات الطبيعية وجها لوجه ضد الضغوطات التي هي من أصل الحيوي أو اللا حيوي.

يبدأ التفاعل مع تبادل الإشارات بين الشريكين حيث الجزيئات الرئيسية التكافلية هي "strigolactones" التي يفرزها شريك النبات، و "العوامل MYC" التي تنتجها الفطريات. و نتجتا لهذه الإشارات الجزيئية يتسبب في سلسلة من الإشارات في الخلايا الجذرية التي تنطوي على العديد من الجينات التي تؤدي إلى التعايشة الفطرية الجذرية. ومن بين هذه الجينات، نذكر *dmi3/ccamk* الذي يميز الكالسيوم يعتمد بروتين كيناز و كالمودولين.

والهدف من عملنا هو إنشاء قاعدة بيانات للجين *dmi3* التي تحتوي على جميع المعلومات المتعلقة بهذا الجين في أنواع مختلفة تنتمي إلى عائلات مختلفة. وأظهرت النتائج أن *dmi3* يختلف من نوع إلى آخر و حتى داخل العائلة نفسها.

**الكلمات المفتاحية :** العوامل Myc "mycorrhization على" الإشارات الجزيئية، *dmi3*، قاعدة البيانات.

## *Liste des abréviations*

---

**BD ou BDD** : Base De Données

**CCaMK** : Protéine Kinase Calcium et Calmoduline dépendante

**CM** : Champignons Mycorhiziens

**CMA** : Champignons Mycorhiziens à Arbuscules

**DMI** : Does not Make Infections

**IPD3** : Interacting Protein of DMI3

**Lj PT4** : Transporteur de Phosphore chez *Lotus japonicus*

**LCO** : LipoChito-Oligosaccharides

**Myc** : Mycorhization

**Mt PT4** : Transporteur de Phosphore chez *Medicago truncatula*

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**NSP** : Nodulation Signaling Pathway

**PAM** : La Membrane Péri-Arbusculaire

**PPA** : L'Appareil de Pré-Pénétration

**Primers F** : primers ou amorces forward

**Primers R** : primers ou amorces reverse

**RAM** : Required for Arbuscular Mycorrhization

**SbtM1** : Ser subtilisin-like

**SGBD** : Système de Gestion de Base de Données

**SM** : Symbiose Mycorhizienne

**SMA** : Symbiose Mycorhizienne à Arbuscules

## Liste des figures

---

<b>Figure 1 :</b> Association plante/champignon mycorhizien.....	4
<b>Figure 2 :</b> Types de mycorhizes.....	6
<b>Figure 3 :</b> Quelques plantes symbiotiques.....	8
<b>Figure 4 :</b> Quelques champignons symbiotiques.....	10
<b>Figure 5 :</b> Dialogue moléculaire <i>Medicago truncatula</i> / <i>Rhizophagus irregularis</i> .....	11
<b>Figure 6 :</b> Modèle génétique de la voie de signalisation « Myc » chez les Légumineuses.....	13
<b>Figure 7 :</b> Transduction du signal symbiotique dans les cellules racinaires de <i>M. truncatula</i> .....	15
<b>Figure 8 :</b> Structure du gène <i>dmi3</i> chez <i>M. truncatula</i> .....	32
<b>Figure 9 :</b> Tables utilisées pour la création d'une base de données du gène <i>dmi3</i> .....	33
<b>Figure 10 :</b> Table des espèces étudiées.....	34
<b>Figure 11 :</b> Table d'introns et d'exons du gène <i>dmi3</i> .....	35
<b>Figure 12 :</b> Table de motifs de la protéine DMI3.....	36
<b>Figure 13 :</b> Tables de primers du gène <i>dmi3</i> .....	37
<b>Figure 14 :</b> Table du gène <i>dmi3</i> présentant sa taille, sa localisation chromosomique et son pourcentage en GC.....	37
<b>Figure 15 :</b> Table de la protéine DMI3 présentant le nombre d'acides aminés et le PI.....	38

## Sommaire

---

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

### **Chapitre I : La symbiose mycorhizienne**

1. Historique .....	3
2. Qu'est-ce que la mycorhization ?.....	3
3. Types de mycorhizes.....	4
3.1. Les Ectomycorhizes.....	4
3.2. Les Endomycorhizes.....	5
3.3. Les Ectendomycorhizes.....	5
4. Rôle des mycorhizes.....	6
5. Partenaires symbiotiques .....	7
5.1. Le partenaire végétal.....	7
5.2. Les champignons symbiotiques.....	7
6. Dialogue moléculaire et voie de signalisation symbiotique « Myc ».....	9
6.1. Dialogue moléculaire.....	9
6.2. Mise en place de la voie de signalisation « Myc ».....	12

### **Chapitre II- Comment créer une base de données ?**

1. Généralités sur la bioinformatique.....	19
1.1 Historique et définition .....	19
1.2. Domaine d'utilisation et d'application .....	19
2. Gérer l'information .....	20
2.1. Banques de données.....	20
2.2. Bases de données.....	21
3. Comment créer une base de données du gène <i>dmi3</i> ? .....	23

### **Chapitre III- Base de données du gène *dmi3***

## *Sommaire*

---

1. Présentation du gène <i>dmi3</i> .....	32
2. Présentation des tables utilisées pour la création d'une base de données du gène <i>dmi3</i> .....	33
2.1. Table d'espèces.....	33
2.2. Table d'introns et d'exons.....	34
2.3. Table de motifs.....	34
2.4. Table de primers.....	36
2.5. Table de gène.....	36
2.6. Table de protéine.....	38
 <i>Conclusion générale</i> .....	 39
 <i>Références bibliographiques</i> .....	 41

# *Introduction générale*

---

## *Introduction générale*

---

Depuis qu'elles ont conquis la surface de la terre il y a environ 475 millions d'années, les plantes ont développé de nombreuses stratégies pour faire face aux carences en eau et en nutriments essentiels de leur environnement. L'une des plus fascinantes est sans doute la mise en place d'associations symbiotiques racinaires avec des microorganismes du sol, qui engendrent des bénéfices mutuels pour l'hôte et son microsymbiote.

Ces interactions symbiotiques sont diverses et se retrouvent dans tous les écosystèmes, ce qui reflète leur importance pour le développement des plantes. Le mot symbiose fut utilisé pour la première fois par l'allemand Frank (1877) pour qualifier la coexistence d'organismes différents. On appelle le plus petit « symbiote » et le plus grand « hôte ».

La symbiose mycorhizienne (SM) est une association obligatoire et à bénéfice réciproque entre une racine de plante et un champignon. Ceci est vrai pour la majorité des plantes terrestres et pour la totalité des plantes ligneuses, dont en particulier les arbres forestiers. Les interactions entre les racines de la plante et les champignons du sol sont déterminées par un dialogue moléculaire impliquant une grande variété de molécules de communication.

Les champignons mycorhiziens (CM), éléments de la population des microorganismes de la rhizosphère, sont incapables de photosynthèse et sont complètement dépendants pour les substances carbonées, de la plante qu'ils colonisent. Ils fournissent en retour de l'azote, du phosphore et d'autres substances minérales qu'ils sont capables de mobiliser grâce à leurs connexions hyphales avec le sol (Béreau, 2003).

La mise en place de telles symbioses est un phénomène biologique qui suppose l'existence de voies de signalisation permettant la reconnaissance entre les deux partenaires (champignon et plante). Au cours de la SM, la plante autorise à un microorganisme fongique de pénétrer ses racines jusqu'aux cellules corticales (Elmalyani, 2013).

Un dialogue moléculaire entre les CM et leurs plantes hôtes est donc nécessaire pour permettre cette reconnaissance mutuelle des deux partenaires (Gianinazzi-Pearson, 1996). Ce dialogue est réalisé par la participation de la plante hôte par la sécrétion des

## *Introduction générale*

---

strigolactones dans ses exsudats racinaires, et le CM, par la production des molécules diffusibles perçues par la plante dites « facteurs MYC ».

Plusieurs gènes sont impliqués dans la perception et la transduction des signaux symbiotiques mycorhiziens. Parmi eux, on trouve le gène *dmi3* (*doesn't make infections*) codant une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline (Levy *et al.*, 2004).

### **- Objectifs du travail :**

L'objectif de notre travail est de créer une Base de Données (BD) pour analyser le gène *dmi3* chez différentes espèces végétales appartenant à différentes familles. Pour ce faire, dix tables ont été créées comme la : table de motifs, table d'introns, table d'exons, table d'ARNm... etc. Les informations requises pour la création de cette BD ont été tirées, pour la plupart, de la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Notre mémoire est présenté en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur la mycorhization et sur la voie de signalisation « Myc ».
- le deuxième chapitre, représente l'approche méthodologique pour la création d'une BD.
- et enfin, le troisième chapitre sera consacré aux résultats de la base de données du gène *dmi3*.

# *Chapitre I- La symbiose mycorhizienne*

---

### 1. Historique

Depuis leur extension dans l'écosystème terrestre, les plantes ont adopté des stratégies en relation avec leur pouvoir d'adaptation. Parmi celles-ci, les systèmes racinaires ont établi des relations mutualistes avec des microorganismes telluriques, désignés sous le nom de « Champignons Mycorhiziens » (CM). Ces derniers, sont apparus sur terre il y a environ 400 millions d'années et sont considérés comme étant à l'origine de la flore terrestre (Simon *et al.*, 1993 ; Selosse et Tacon, 1997). Ces relations symbiotiques sont caractérisées par un état d'équilibre physiologique permettant aux symbiotes impliqués, d'en retirer des bénéfices mutuels.

Ces interactions sont les plus fréquentes et intéressent plus de 90 % des plantes terrestres (Sanders *et al.*, 1996) et qui font intervenir un groupe de champignons de la classe des Glomeromycètes : ce sont les Champignons Mycorhiziens à Arbuscules (CMA), connus depuis la fin du dix huitième siècle (Strullu, 1990). Ces espèces sont cosmopolites et colonisent la majorité des familles de plantes, depuis les Bryophytes jusqu'aux Angiospermes (Boullard, 1990 ; Demars et Broener, 1995) et particulièrement les plantes à valeurs économiques importantes. Ces microorganismes à haut niveau d'organisation dans cette association, déterminent les conditions de liaison dans lesquelles le champignon peut croître, se reproduire et évoluer (Morton, 1993).

### 2. Qu'est-ce que la mycorhization ?

Le terme "Mycorhize" désigne une association à bénéfice réciproque entre la racine d'un végétal et le mycélium d'un champignon du sol (Strullu, 1991). Littéralement, il veut dire "Champignon/Racine" (du grec mukês : champignon, et rhiza : racine).

Dans cette association symbiotique, le végétal fournit au champignon des sucres. En retour le champignon alimente la plante en éléments minéraux notamment en phosphore grâce à un réseau dense de filaments appelé « mycélium extra-matriciel » qui augmente considérablement la surface de contact entre les racines des plantes hôtes et le sol (**Figure 1**) (Sieverding, 1991).

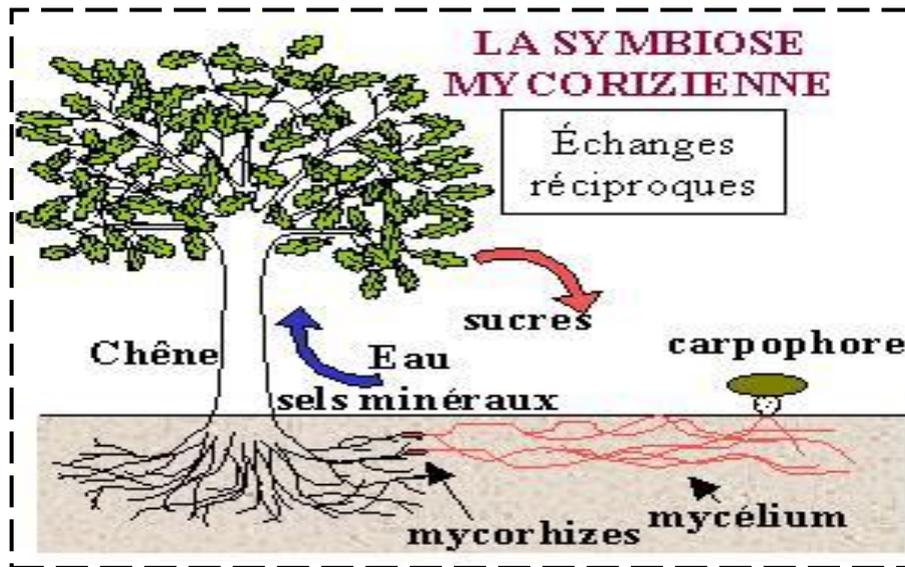


Figure 1 : Association plante/champignon mycorhizien .

Ceci est vrai pour la majorité des plantes terrestres et pour la totalité des plantes ligneuses, dont en particulier les arbres forestiers. En effet, le champignon se nourrit des sucres et des acides aminés synthétisés par la plante-hôte et procure à cette dernière les éléments nécessaires à sa nutrition minérale en lui permettant une meilleure extension et absorption racinaire (Harley et Smith, 1983).

### 3. Types de mycorhizes

Selon un certain nombre de critères écologiques, morphologiques et physiologiques, on distingue différents types de mycorhizes (**Figure 2**)

#### 3.1. Les Ectomycorhizes

Ce sont des symbioses formées par des champignons colonisant principalement les arbres et arbustes (en majorité Pinaceae, Betulaceae, Fagaceae, Salicaceae, Myrtilaceae) des régions boréales, tempérées et montagneuses, qui produisent souvent des carpophores à la surface des sols forestiers. Ce sont majoritairement des Ascomycètes (truffes, terfez) et des Basidiomycètes (amanites, chanterelles, cortinaires...). Ils se développent de manière intercellulaire, en effet le mycélium progresse entre les cellules du cortex racinaire mais ne pénètre pas dans les cellules vivantes.

Les Ectomycorhizes se caractérisent par la formation de tissus spécialisés. Outre les hyphes extra-matriciels se propageant dans le milieu extérieur et assurant le rôle d'exploration et d'absorption, on distingue les hyphes agglomérés autour de la racine, formant un manchon fongique pseudo-parenchymateux ou manteau gainant, et les hyphes qui s'insinuent entre les cellules du cortex formant un réseau appelé réseau de Hartig. C'est au niveau de ce réseau que se font les échanges d'éléments nutritifs entre le champignon et la plante (Redon, 2009).

### 3.2. Les Endomycorhizes

Les « Endomycorhizes » ou les « Mycorhizes à Vésicules et Arbuscules » (**Figure 2**) concernent environ 95% des taxons végétaux à mycorhizes et ce type est non visible à l'œil nu (Read, 1991). Ces taxons végétaux, dont un grand nombre d'espèces ligneuses ne formant pas des massifs forestiers (Cupressaceae, Rosaceae, Juglandaceae, Aceraceae, etc.). Des Ecto- et des Endomycorhizes Arbusculaires sont parfois simultanément présentes sur un petit nombre d'espèces ligneuses appartenant aux Salicaceae (*Populus*,...), Myrtaceae (*Eucalyptus*,...), Juglandaceae (*Juglans*,...), etc. Les champignons qui engendrent ce type de mycorhize appartiennent aux Zygomycètes (ordre des Glomales) (Mousain, *et al.*, 2013).

Les endomycorhizes arbusculaires ne présentent pas de manteau fongique ni de modification morphologique. Le mycélium pénètre entre les cellules du cortex des racines ou franchit les parois de ces cellules en repoussant leur plasmalemme sans le traverser. Ces mycorhizes se caractérisent par la présence constante d'arbuscules intracellulaires qui sont un lieu d'échange entre la plante-hôte et le champignon. Le mycélium intramatriciel est connecté avec un réseau d'hyphes externes dont le développement est souvent considérable (Tisdall et Oades, 1979).

### 3.3. Les Ectendomycorhizes

Il arrive que les ectomycorhizes et les endomycorhizes soient présents en même temps sur une racine, on parle alors « d'ectendomycorhizes ». Le premier type est minoritaire et concerne surtout les arbres, le second est majoritaire et concerne presque tous les végétaux. Ils montrent simultanément, un manteau réduit ou absent qui possède un réseau de Hartig bien développé, des structures des ectomycorhizes et des hyphes qui

pénètrent dans les cellules racinaires et des structures des endomycorhizes comme chez *Acacia* (*Robinia pseudoacacia*) (Hamza, 2014).

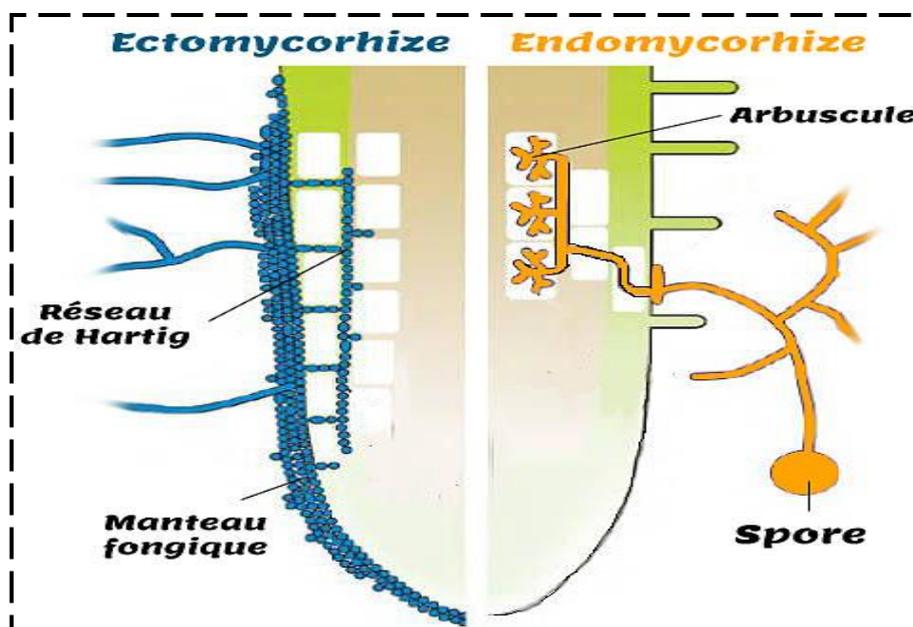


Figure 2 : Types de Mycorhizes (Sylo, 2016).

#### 4. Rôle des mycorhizes

Les CM permettent aux plantes d'absorber plus de nutriments et d'eau contenus dans le sol. Ils augmentent aussi la tolérance aux différents stress environnementaux. De plus, ces organismes jouent un rôle majeur dans le processus d'agrégation des particules du sol et stimulent l'activité microbienne.

Selon l'espèce, les pratiques et les conditions de culture, la mycorhization procure des avantages aux végétaux et à l'environnement :

- ✓ Produit des végétaux plus vigoureux et en santé.
- ✓ Augmente l'établissement des plantes et leur survie lors du semis ou de la transplantation.
- ✓ Accroît le rendement et la qualité des récoltes.
- ✓ Améliore la tolérance à la sécheresse, permettant la réduction des arrosages.
- ✓ Améliore la floraison et la fructification.
- ✓ Optimise l'utilisation des fertilisants, spécialement du phosphore.
- ✓ Accroît la tolérance à la salinité du sol.

- ✓ Réduit l'apparition de maladies.
- ✓ Contribue au maintien de la qualité du sol et du cycle des éléments nutritifs.
- ✓ Contribue au contrôle de l'érosion du sol.

### 5. Partenaires symbiotiques

#### 5.1. Le partenaire végétal

La Symbiose Mycorhizienne (SM) est largement distribuée au sein du règne végétal. Elle inclut quelques bryophytes, les ptéridophytes, les gymnospermes et 90% des espèces d'angiospermes (Harley and Harley, 1987; Newman and Reddell, 1987). L'absence de capacité mycorhizienne se retrouve chez certaines espèces de plantes et semble liée à une perte de fonction et à l'apparition d'un nouveau caractère. Par exemple, chez les Gymnospermes, sauf chez de rares exceptions, les Pinaceae ne sont pas endomycorhizables mais interagissent avec les Champignons ectomycorhiziens (Wang et Qiu, 2006). Les Brassicaceae non mycotrophes, comme la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ont souvent des poils racinaires plus longs, et donc une capacité naturelle plus grande à absorber l'eau et les nutriments (Bucher, 2007).

Il existe également quelques exceptions comme les Légumineuses du genre *Lupinus* ou *Marchantia polymorpha* qui n'établissent pas une Symbiose Mycorhizienne à Arbuscules (SMA). Mises à part ces exceptions, la SMA reste un trait extrêmement répandue dans la lignée verte. Elle a très certainement joué un rôle crucial dans l'adaptation et l'évolution des plantes terrestres (Delaux, 2011). La **Figure 3** nous montre quelques plantes qui forment une SM.

#### 5.2. Les champignons symbiotiques

La grande majorité des végétaux terrestres vivent en étroite collaboration avec de nombreux organismes du sol parmi lesquels on retrouve les CM qui ont une forme dite mycélienne, constituée d'un réseau d'hyphes qui ressemble en fait à un amas de filaments. Ces hyphes leur permettent de parcourir des distances beaucoup plus longues que les racines des plantes, ce qui leur donne accès à des nutriments inaccessibles par les plantes. (Dechamplain, 2002).



Figure 3 : Quelques plantes symbiotiques.

Les CM, éléments de la population de microorganismes de la rhizosphère, sont incapables de photosynthèse et sont complètement dépendants, pour les substances carbonées, de la plante qu'ils colonisent. Ils fournissent en retour de l'azote, du phosphore et d'autres substances minérales qu'ils sont capables de mobiliser grâce à leurs connexions hyphales avec le sol. De ce fait, la SM est activement étudié pour ses effets bénéfiques sur la croissance des plantes et son rôle potentiel en agriculture et foresterie (Béreau, *et al.*, 2003).

Chaque champignon s'associe à une essence particulière : la truffe avec le chêne, le bolet des charmes près des arbres qui lui donnent son nom, le bolet élégant sous les mélèzes et le bolet granulé sous les pins. Les champignons cohabitent également avec les orchidées, permettant à ces plantes de germer et souvent de fleurir (Voir **Figure 4** pour les exemples de CM) (Guinberteau et Courtecuisse, 1997).

### 6. Dialogue moléculaire et voie de signalisation symbiotique « Myc »

#### 6.1. Dialogue moléculaire

Au cours de la SM, la plante autorise à un microorganisme fongique de pénétrer ses racines jusqu'aux cellules corticales. Ce phénomène nécessite une reconnaissance spécifique entre les deux partenaires. La plante devant notamment s'assurer que le champignon est bien un hôte potentiel et non un pathogène tentant de pénétrer ses racines. (Elmalyani et Elidrissi, 2013).

Un dialogue moléculaire entre les CM et leurs plantes hôtes est donc nécessaire pour permettre cette reconnaissance mutuelle des deux partenaires. Ce dialogue est réalisé par la participation de la plante hôte par la sécrétion des strigolactones dans ses exsudats racinaires et le CM par la production des molécules diffusibles perçues par la plante dites : « facteurs Myc » (**Figure 5**) (Gianinazzi-Pearson, 1996).

En premier lieu, ces signaux d'appels sont émis par chacun des deux partenaires. Des substances chimiques sont émises à la fois par le champignon mais aussi par les racines des plantes. Les premiers signaux d'appel, qui sont à l'origine de la symbiose, proviennent des racines des plantes. Ce sont des exsudats comprenant des composés volatiles organiques (VOCs), des flavonoïdes et des attractants chimiques qui permettent la germination des hyphes des CM.



*Glomus mossea*



*Laccaia ehienensis*



*Russula sanguinea*



*Hebeloma sacchariolens*



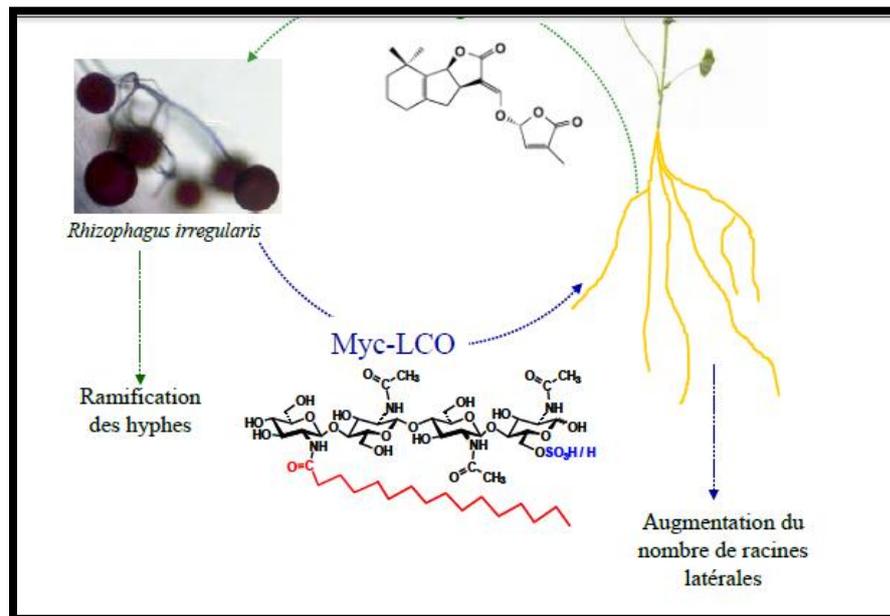
*Lactarius circellatus*



*Leccinum carpini*

**Figure 4 :** Quelques champignons symbiotiques.

Les flavonoïdes, induisent l'expression de gènes « Myc » par le CM. Dans un deuxième temps, les champignons émettent à leur tour des signaux d'appel en réponse aux premiers signaux émis par les racines, mais aussi des composés chitiniques, des protéines, des polysaccharides de surface ou encore des hormones (Elmalyani et Elidrissi, 2013).



**Figure 5 :** Dialogue moléculaire *Medicago truncatula/Rhizophagus irregularis* (Rival, 2013).

### a. Les strigolactones

Les strigolactones sont des molécules organiques de la famille des sesquiterpènes (Akiyama et Hayashi, 2006). Elles sont présentes dans les exsudats racinaires et sont responsables de la réponse du champignon (Akiyama *et al.*, 2005). Ces molécules naturelles agissent sur le champignon à très faible concentration, jusqu'à  $10^{-13}$  M. Il a été montré qu'elles induisent une prolifération cellulaire chez le CM qui s'accompagne d'une augmentation importante de la respiration et de la densité en mitochondries et une modification du mouvement des mitochondries, indiquant une modification claire de l'état physiologique du CM (Besserer *et al.*, 2006 ; Tamasloukht *et al.*, 2003). Il est intéressant aussi de noter que ces molécules ont également été montrées comme activant la germination des graines de plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* (Bouwmeester *et al.*, 2003 ; Bouwmeester *et al.*, 2007).

### b. Les facteurs « Myc »

Plusieurs travaux de recherche indiquent que les CM synthétisent des molécules diffusibles perçues par la plante. Des travaux récents de deux équipes italiennes ont montré une réponse calcique des cellules de plante à des molécules émises par un CM. En utilisant des cultures de cellules de soja (*Glycine max*) exprimant l'aequorine (une protéine émettrice de lumière en présence de calcium), les chercheurs ont montré une élévation rapide et transitoire de la concentration cytoplasmique en calcium en réponse à l'ajout d'un milieu de culture dans lequel des spores de *Gigaspora Margarita* avaient germé. Cette réponse calcique semble être élicitée par des molécules partiellement lipophiles de moins de 3kDa. Il semble donc clair que des molécules diffusibles produites par des CM peuvent avoir un effet à distance sur les racines des plantes (Navazio *et al.*, 2007).

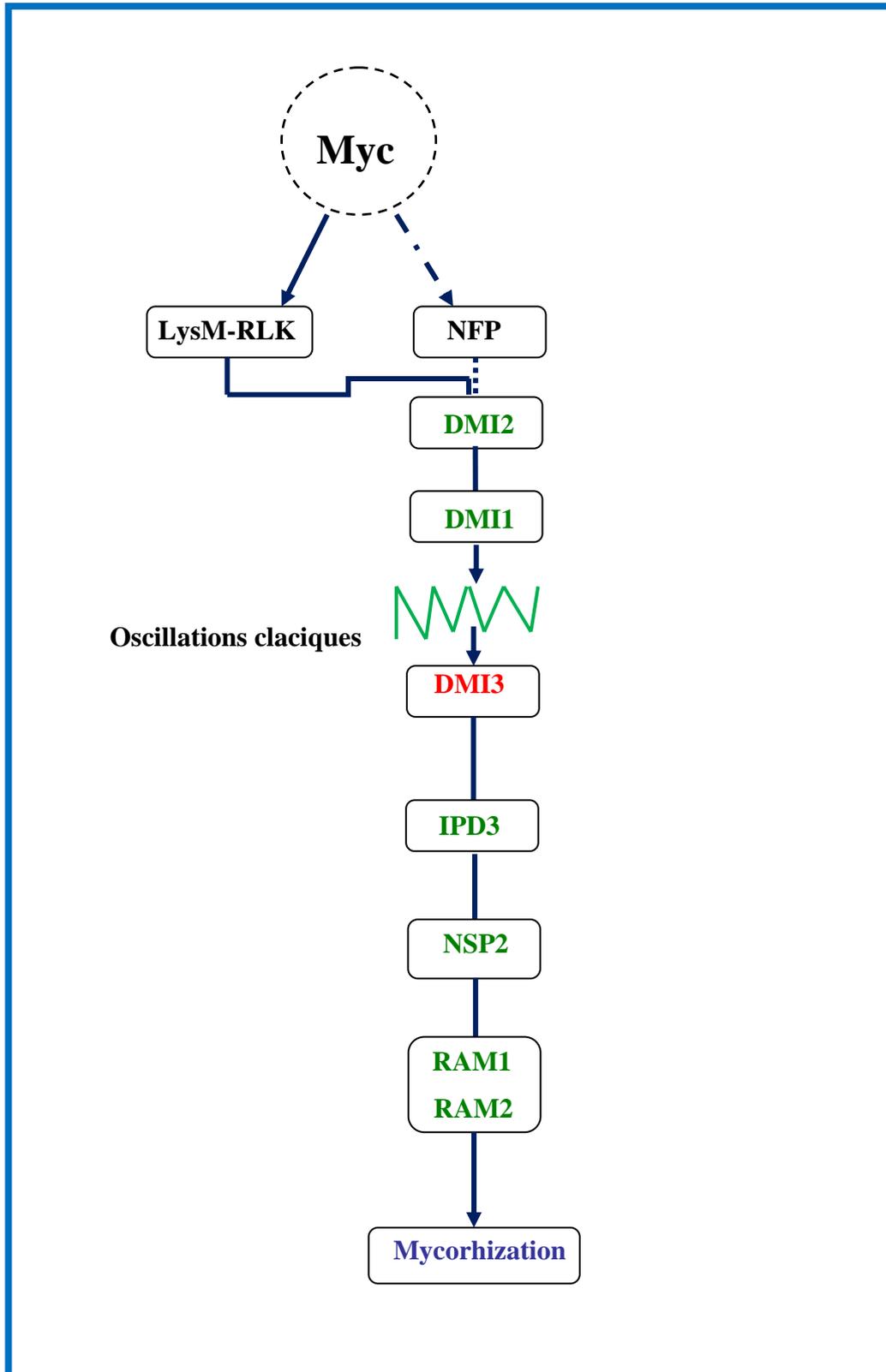
### 6.2. Mise en place de la voie de signalisation « Myc »

La voie de signalisation « Myc » est peu connue. Les facteurs « Myc » (par analogie avec les facteurs de nodulation « Nod ») restent à identifier. Les Endomycorhizes étant apparues avant les Endosymbioses fixatrices d'azote, les chercheurs émettent l'hypothèse que la voie de transduction du signal mycorhizien a été recrutée par les bactéries fixatrices d'azote (Delaux, 2011).

La voie « Myc » présente des étapes communes avec la voie « Nod » : intervention de plusieurs gènes comme *dmi1*, *dmi2* et *dmi3* (*does not make infections*). Les seules différences sont la fréquence et l'intensité des oscillations calciques, ainsi que la réponse de *dmi3*, d'où l'intérêt de connaître ses substrats. (Gobbato *et al.*, 2012).

#### a. Perception des facteurs « Myc » par les récepteurs de la plante

Avant la formation des mycorhizes, des signaux symbiotiques de type flavonoïdes sont sécrétés par les racines et induisent l'expression des gènes « Myc » du CM qui contrôlent et régulent la production de signaux fongiques (facteurs « Myc »). Ces facteurs sont reconnus par le complexes récepteurs LysM-RLK (récepteurs de la membrane plasmique) provenant de la plante hôte pour les transporter et déclenchant le mécanisme d'amplification et de transduction des trois gènes *dmi1* et *dmi2*. Enfin le gène *dmi3* induit la formation des hyphes ou appressoriums (**Figure 6**) (Rival, 2013).



**Figure 6** : Modèle génétique de la voie de signalisation « Myc » chez les Légumineuses (Maillet *et al.*, 2011).

### b. Transduction de la voie de signalisation « Myc »

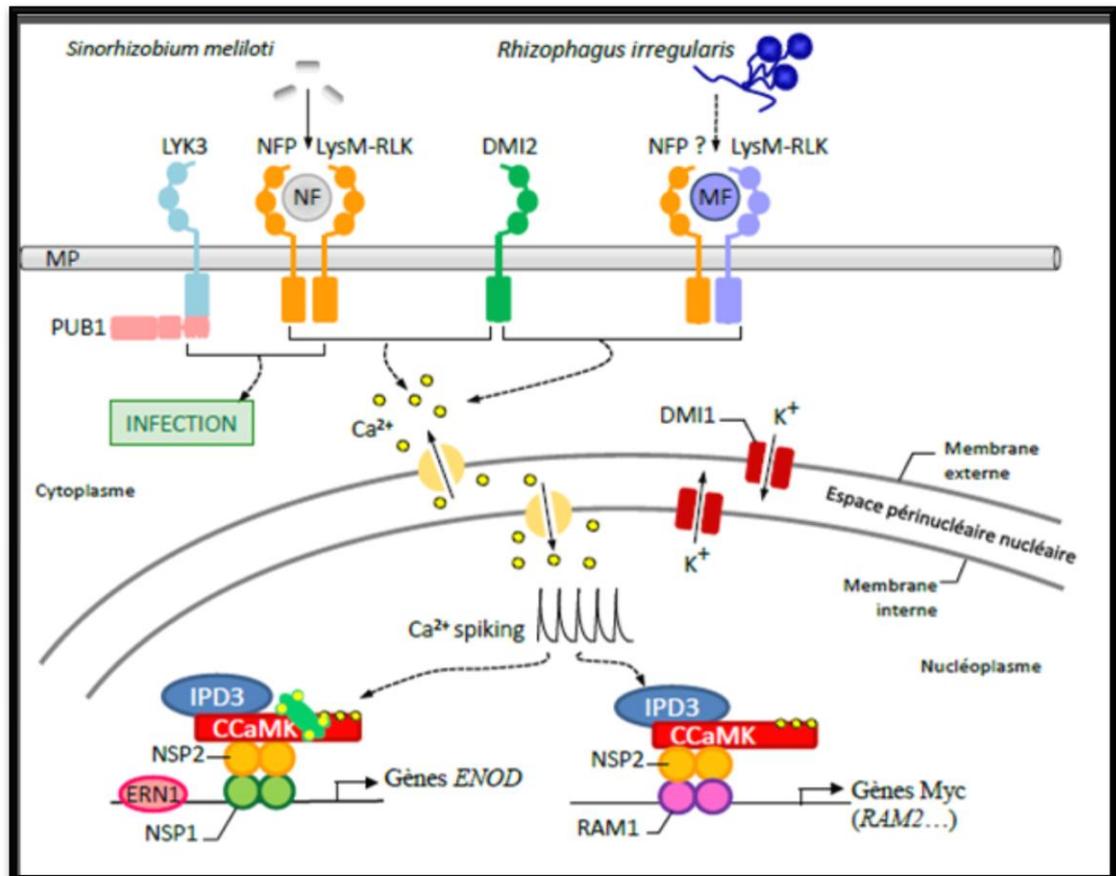
On connaît peu de gènes impliqués dans la voie de transduction spécifique du signal « Myc ». Gobato et coll. ont identifié un facteur de transcription à domaine GRAS spécifique de la mycorhization appelé RAM1 (*Required for Arbuscular Mycorrhization 1*) (Gobbato *et al.*, 2012).

Chez le mutant *ram1* de *Medicago truncatula*, le nombre d'hyphopodia formés à la surface de la racine est significativement diminué par rapport à la plante sauvage, par conséquent la colonisation par le champignon n'a pas lieu. En revanche, chez ce mutant les oscillations calciques sont présentes, la colonisation par *Rhizobium* n'est pas altérée et des nodules fixateurs sont formés. De plus, *ram1* est induit durant la colonisation mycorhizienne mais pas au cours de l'interaction avec *Sinorhizobium meliloti*, et serait donc un composant spécifique de la voie de signalisation mycorhizienne. *ram1* interagit avec *nsp2* (*nodulation signaling pathway*) en double hybride chez la levure et en BiFC dans le noyau, cependant aucune interaction entre *ram1* et *nsp1* n'a été détectée (Gobbato *et al.*, 2012).

Les auteurs proposent que l'activation de la voie de signalisation « Myc » serait déterminée par la formation d'un complexe de protéine GRAS : et NSP2/RAM1 respectivement (**Figure 7**). *ram1* régule l'expression du gène spécifique à la mycorhization *ram2*. *ram2* code une glycerol-3-phosphate acyl transférase (GPAT) impliquée dans la production de monomères de cutine (Gobbato *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Comme pour le mutant *ram1*, le mutant *ram2* n'est pas colonisé par les CM, la production de strigolactones ne semble pas altérée puisque la germination des spores et la ramification des hyphes sont toujours observées (Rival, 2013).

De plus, les oomycètes pathogènes présentent une altération de la formation de leur appressoria chez le mutant *ram2*, ce qui le rend moins sensible (Wang *et al.*, 2012). Il semblerait que les monomères de cutine agissent comme des signaux végétaux qui stimuleraient la colonisation des CM. Par ailleurs plusieurs gènes marqueurs de la mycorhization ont été identifiés. Chez *Lotus japonicus*, l'infection fongique induit l'expression du gène *SbtM1* codant une protéase Ser subtilisin-like (subtilase), et PT4 codant un transporteur de phosphate (Takeda *et al.*, 2009 ; Takeda *et al.*, 2011).

Le gène *SbtMI* est régulé par la voie de signalisation symbiotique commune et son expression est induite uniquement par la mycorhization. L'extinction par ARN interférent de l'expression de *SbtMI* diminue l'élongation des hyphes et la formation d'arbuscules (Takeda *et al.*, 2009). *LjPT4* serait l'orthologue du gène *MtPT4* isolé chez *M. truncatula* (Guether *et al.*, 2009 ; Harrison *et al.*, 2002). *MtPT4* est essentiel pour empêcher une sénescence précoce des arbuscules (Javot *et al.*, 2007).



**Figure 7 :** Transduction du signal symbiotique dans les cellules racinaires de *M. truncatula* (Shimoda *et al.*, 2012 et Singh et Parniske, 2012)

### c. Intervention des facteurs de transcription et formation de l'appressoria

La mise en place de cette symbiose nécessite des signaux produits par les deux partenaires : les strigolactones en exsudats racinaires stimulent la croissance pré-symbiotique du champignon (Maillet *et al.*, 2011), et les facteurs « Myc » qui prépare l'usine de symbiose. Ici, ils ont étudié les événements en aval de cette signalisation précoce dans les racines. Ils rapportent que l'expression de miR171h, un microARN qui

cible NSP2, est régulée à la hausse dans la zone d'allongement de la racine lors de la colonisation par les (anciennement *Glomus intraradices*) de *Rhizophagus* et en réponse à « Myc » (Delaux *et al.*, 2013).

La colonisation fongique a été fortement réduite par la surexpression de microARN miR171h dans les racines, mimant le phénotype des mutants de *nsp2*. A l'inverse, dans les plantes exprimant un ARNm *nsp2* résistant à la coupure miR171h, la colonisation fongique a été beaucoup augmentée et prolongée dans la zone d'allongement des racines. Enfin, les analyses phylogénétiques ont révélé que la réglementation miR171h de *nsp2* est probablement conservée parmi les plantes mycotrophes. Leurs résultats suggèrent un mécanisme de régulation, déclenché par « Myc », qui empêche trop la colonisation des racines par des CMA par un mécanisme impliquant la régulation négative miARN médiée par des *nsp2* (Lauessergues *et al.*, 2012).

Depuis quelques années, le gène *nsp1* qui est un facteur de transcription GRAS, a été considéré comme étant impliqué dans la nodulation. Des chercheurs ont analysé le degré de conservation de sa séquence dans la SMA. Les résultats révèlent que *nsp1*, décrit précédemment pour son implication dans la nodulation, est également impliqué dans la voie de signalisation « Myc » (Delaux *et al.*, 2013).

Dans la plupart des cas, comme par exemple chez les Fabacées, le champignon forme un appressoria lorsque celui-ci arrive au contact des racines de la plante concernée. Cette structure d'infection (= appressoria) est en fait mis en place par un contact seulement physique de celle-ci avec une couche de cellules épidermiques isolée de racines et en absence d'échange de signaux. . Mais avant cette formation de cet appressoria, des signaux symbiotiques sont sécrétés par les racines et induisent l'expression de gène « *Myc* ».

Ces facteurs sont probablement perçus par des récepteurs de type LysM-RLK. Cette perception provoque une cascade de signalisation faisant intervenir *dmi2* et *dmi1* conduisant à la génération d'oscillations calciques. Ces oscillations sont perçues par la protéine kinase calcium et calmoduline dépendante codée par *DMI3*, elle-même interagissant avec la protéine codée par *IPD3* (*Interacting Protein of DMI3*). En aval de *nsp2* les voies de signalisation symbiotique divergente (**Figure 5**) (Rival, 2013).

Ces facteurs « Myc », induisent de profondes transformations dans les racines de l'hôte pour préparer l'infection symbiotique et induire l'organogenèse des appressoriums

(morcellement de la vacuole centrale, augmentation du volume du cytoplasme, attraction des hyphes des champignons vers les racines des Fabacées...). Durant la formation de l'appressorium, les cellules épidermiques sous-jacentes réagissent avec un programme de réorganisation cellulaire qui est assez intéressant. Premièrement, le noyau migre rapidement à une position juste en-dessous de l'appressorium et ensuite il s'éloigne et se rapproche près d'un agrégat de microtubules formant ainsi une structure en forme de doigt : l'appareil de pré-pénétration (PPA). Celui-ci pénètre à l'intérieur des cellules du lumen. Cette structure contient des quantités importantes de réticulum endoplasmique mais aussi des microtubules et des filaments cellulaires. Le PPA définit une trajectoire à travers les cellules, ce qui permet l'invasion et la pénétration des hyphes fongiques (Redon, 2009).

Pendant la mise en place de la symbiose, d'autres signaux sont émis comme c'est le cas avec l'appressoria qui émet un signal local qui permet aux cellules épidermiques sous-jacentes de le détecter avec précision. La colonisation intracellulaire des premières cellules épidermiques est suivie par une phase de progression intercellulaire du champignon à l'intérieur du cortex racinaire et le long de ses cellules longitudinales. Cette phase est contrôlée par des signaux provenant des racines des plantes. Le développement de la symbiose se poursuit par l'établissement d'une interface symbiotique qui sert à échanger des substances nutritives et des signaux possibles (Nagahashi et Douds, 1997).

Le champignon a inventé une structure intracellulaire spécialisée : « l'arbuscule », pour faciliter l'échange des éléments nutritifs avec la plante. Celle-ci est composée d'une ramification d'hyphes importants avec des bouts terminaux très fins ce qui permet d'avoir un rapport de volume de surface plus grand qu'avec un hyphe normal et un transfert d'éléments nutritifs particulièrement efficace. La formation de ces arbuscules, comme l'entrée à l'intérieur des cellules épidermiques des racines, est accompagnée par des changements importants dans l'organisation cellulaire des cellules hôte. Par exemple, le morcellement de la vacuole centrale, la migration nucléaire à partir de la périphérie jusqu'au centre de la cellule, et le réarrangement du cytosquelette. Bien que les Arbuscules soient intracellulaires, ils restent entourés par une membrane de la plante : la membrane péri-arbusculaire (PAM), laquelle est en continuité avec le plasmalemme fongique. L'espace entre la PAM et le plasmalemme fongique, c'est à dire l'interface symbiotique, comprend des restes de couches cellulaires fongiques et du matériel apoplastique de la plante. (Harrison *et al.*, 2002 ; Poulsen *et al.*, 2005).

## *Chapitre I- La symbiose mycorhizienne*

---

En fin de compte, l'arbuscule occupe une partie importante du volume cellulaire. Les cellules habitées par les arbuscules développent par la suite un mécanisme élaboré pour activer le transfert des éléments nutritifs. Elles expriment des transporteurs de phosphate qui résident dans la PAM et servent probablement à prendre le phosphate qui est délivré par les arbuscules (Harrison *et al.*, 2002 ; Poulsen *et al.*, 2005).

# *Chapitre II- Comment crée une base de donnée ?*

---

### **1. Généralités sur la bioinformatique**

#### **1.1. Historique et définition**

Le terme de « bioinformatique » date du début des années 80. Cependant, le concept sous-jacent de traitement de l'information biologique est bien plus vieux. Durant les années 60, la biologie moléculaire a eu besoin de modélisation formelle, ce qui a mené à la création des biomathématiques. L'apparition de la bioinformatique n'est donc pas une conséquence de la génomique (séquençage d'un génome et son interprétation), mais plutôt une de ses fondations.

La bioinformatique est l'étude de l'information biologique. Ce n'est pas simplement l'application à la biologie de l'informatique ; c'est une branche à part entière de la biologie, et un domaine de recherche qui analyse et interprète des données biologiques, au moyen de méthodes informatiques, afin de créer de nouvelles connaissances en biologie.

La bioinformatique actuelle se concentre surtout sur l'étude des séquences d'ADN et sur le repliement des protéines. De nombreux bioinformaticiens travaillent également à l'élaboration d'outils biologiques permettant de résoudre des problèmes de l'informatique classique.

#### **1.2. Domaines d'utilisation et d'application**

Il existe plusieurs domaines d'utilisations de la bio-informatique :

- La génétique des populations.
- L'environnement (données écologiques).
- La biologie structurale.
- La biologie moléculaire et la génétique.
- L'évolution...

Les domaines d'application de la bioinformatique sont :

En biologie moléculaire :

- Recherche dans les banques.
- Phylogénie et évolution moléculaire.

En virologie :

- Vaccins synthétiques.
- Reconnaissance moléculaire.

En immunologie :

- Synthèse de peptides antigéniques.
- Recherche d'épitopes.

En mutagénèse dirigée :

- Modélisation par homologie.
- Interactions moléculaires. (Mount., 2004)

### **2. Gérer l'information**

#### **2.1. Banques de données**

##### **a. Historique et définition**

Les banques de données sont conçues dans les années 60, aux Etats- Unis, de la conjonction des progrès de l'informatique et de la volonté du gouvernement américain d'améliorer l'efficacité de la recherche dans les domaines proches de la défense (énergie nucléaire, espace). De nombreuses initiatives publiques ont facilité l'émergence de plusieurs sociétés privées, qui ont développé une activité de centre serveur. Ces serveurs, qui existent toujours, ont été accessibles dès le début des années 70 par les réseaux internationaux de télécommunication. C'est ainsi que, dans le monde entier, les chercheurs qui parlent presque tous anglais ont commencé à utiliser les banques de données américaines.

En Europe, des programmes ont été successivement développés depuis 1975, par la Commission des communautés européennes (aujourd'hui Impact II pour la période 1991-1995), pour stimuler l'offre et sensibiliser les utilisateurs potentiels. Comme dans les autres pays développés, le gouvernement français a aidé le secteur des banques de données. Dès 1973 et jusqu'à aujourd'hui, différents organismes ont financièrement soutenu tous les maillons de la chaîne en aidant à la création de banques de données, à l'écriture de logiciels d'interrogation, au lancement de serveurs et d'un réseau d'intermédiaires publics (Accart, 1994).

## *Chapitre II- Comment créer une base de données ?*

---

Une banque de donnée est un ensemble de données relatif à un domaine défini des connaissances, généralement organisé et structuré en base de données pour être offert aux utilisateurs. Besoin de développer des logiciels spécifiques pour interroger les données contenues dans ces banques (Hérault, 2009).

### **b. Types de banques de données**

Les banques de données généralistes contiennent des données hétérogènes et collectent une liste la plus exhaustive possible. On cite quelques exemples :

- Banques de séquences nucléiques.
- Banques de séquences protéiques.
- Banques de structure 3D de macromolécules.
- Banques d'articles scientifiques.

Les banques de données spécialisées contiennent des données homogènes, ainsi la collecte est établie autour d'une thématique particulière qui a l'avantage de mettre à jour les données, de vérifier leur intégrité, et d'offrir une interface adaptée.

## **2.2. Bases de données**

### **a. Historique**

La base de données (1960) était uniquement un système de gestion de fichiers plus ou moins sophistiqués. Dix ans après, fut le début des systèmes de gestion de bases de données, réseaux et hiérarchiques proches des systèmes de gestion de fichiers. Ces systèmes de gestion de bases de données avaient rempli certains des objectifs précédents mais on ne pouvait pas interroger une base sans savoir où était l'information recherchée (on "naviguait") et sans écrire de programmes.

En 1980, les systèmes de gestion de bases de données relationnels apparaissent sur le marché. Dans les années 1990, les systèmes de gestion de bases de données relationnels dominent le marché.

Les bases de données sont actuellement au cœur du système d'information des entreprises. Les systèmes de gestion de bases de données, initialement disponibles uniquement sur des "mainframes", peuvent maintenant être installés sur tous les types d'ordinateurs y compris les ordinateurs personnels. Mais attention, souvent on désigne, par

## Chapitre II- Comment créer une base de données ?

---

abus de langage, sous le nom "bases de données" des ensembles de données qui n'en sont pas (Darmont, 2004).

### **b. C'est quoi une base de données ?**

Une Base De Données (BD ou BDD) est un ensemble structuré de données homogènes, stocké sur un support informatique, et permettant un accès simplifié et sécurisé à ces données *via* un logiciel.

- Ensemble structuré : les données sont réparties dans des tables, comparables à des fichiers de données.
- Données homogènes : on ne "mélange" pas par exemple des données provenant de domaines différents.
- Stocké sur un support informatique : une base de données se présente comme un simple et unique fichier, même si sa taille peut être gigantesque.
- Accès simplifié : les logiciels envoient des requêtes à la base données, qui elle, renvoie les données demandées.

Ce système remplace avantageusement ce qui existait avant, à savoir des fichiers de données, indépendants les uns des autres. Cela demandait beaucoup de travail et de soin aux programmeurs, pour gérer, mettre à jour ou exploiter les données ainsi réparties, et la moindre erreur pouvait générer beaucoup de problèmes.

La BDD a plusieurs caractéristiques :

- Elle n'accepte pas la redondance, c'est-à-dire aucune donnée ne sera répétée dans la base de données.
- Elle n'accepte pas l'incohérence des données.
- Les données doivent être structurées dans la base de données.
- Elle assure la sécurité des informations.
- Elle doit être indépendante des programmes et des données, elle doit permettre la prise en compte facile de nouvelles applications.

### c. Objectifs d'une base de données

Les objectifs que l'on assigne généralement aux bases de données et aux systèmes qui les supportent sont les suivants :

- La centralisation,
- l'indépendance entre les données et les traitements,
- la structuration de données complexes,
- le partage des données,
- l'intégrité et la cohérence,
- la confidentialité,
- la sécurité.

La centralisation des données a pour objet de limiter la redondance, c'est-à-dire d'éviter la présence de duplicata de données. L'information n'étant pas dupliquée, il s'ensuit une unicité de la saisie ainsi qu'une centralisation des contrôles qui peuvent être réalisés par le SGBD (Système de Gestion de Base de Donnée) (Ravat et Zurfluh., 1995).

L'indépendance entre les données et les traitements permet une évolution des structures de données sans répercussion sur les programmes d'application utilisant ces données. Par exemple, il s'agit de garantir le fait de ne pas avoir à recompiler un programme à la suite de la modification d'un format d'une donnée qui ne le concerne pas.

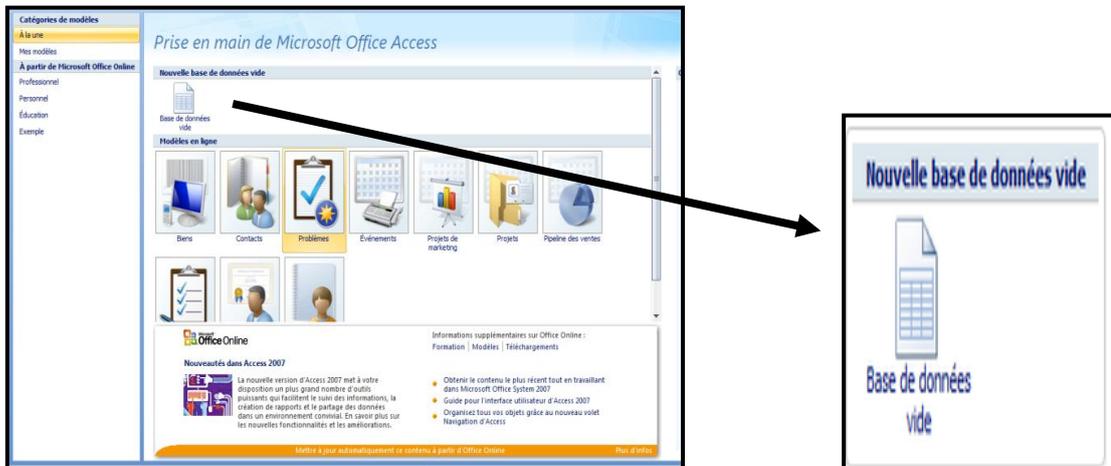
### 3. Comment créer une base de données du gène *dmi3* ?

La BDD est une collection de données cohérentes et structurées. On a créé une BDD du gène *dmi3* afin de connaître la structure fine de ce gène chez les dix espèces choisies appartenant à différentes familles. Neuf tables ont été créées, il s'agit de : la table d'espèces qui présente les espèces étudiées, la table de protéine, la table de gène, la table des primers « R », la table de primers « F », la table d'ARNm, la table des exons, la table des introns, et la table de motif.

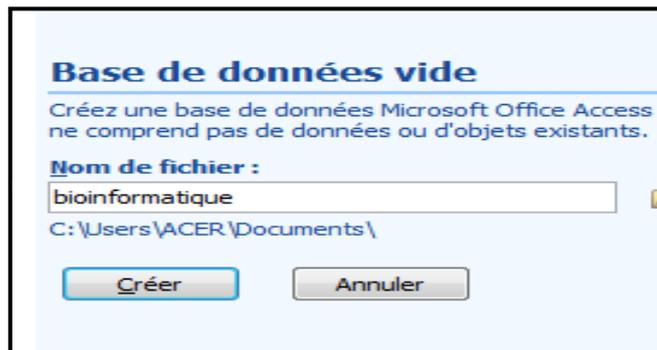
Pour la création de Base de Données, on a plusieurs logiciels comme « Access » de Microsoft et Open Office ou « Libre Office ». Pour le travail élaboré, on a choisi « Access » qui fait partie de la suite Microsoft Office, mais peut être acquis séparément.

## Chapitre II- Comment créer une base de données ?

- Au lancement d' « Access » cliquons sur le bouton 'Base de Données vide'.

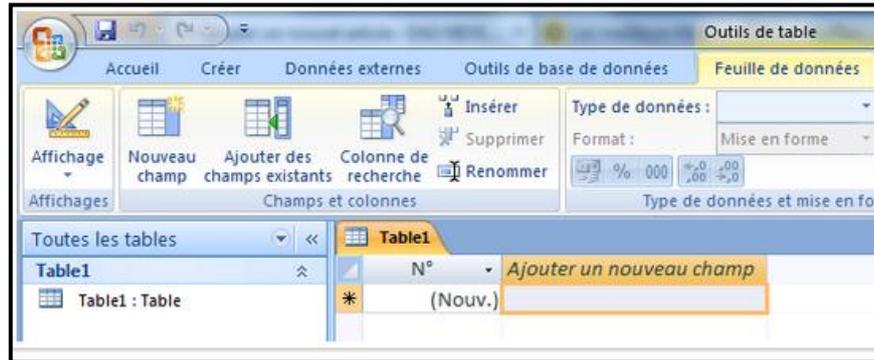


- Saisissez ou vous souhaitez enregistrer notre base de données en bas à droite puis cliquez sur le bouton 'Créer'.



- Une page apparaît positionnée sur le menu 'Feuille de données'. Cette page est divisée en trois parties : celle de gauche liste les tables de notre base de données, à droite le contenu de la table sélectionnée enfin en haut se trouve la barre d'outils et la barre de menus.

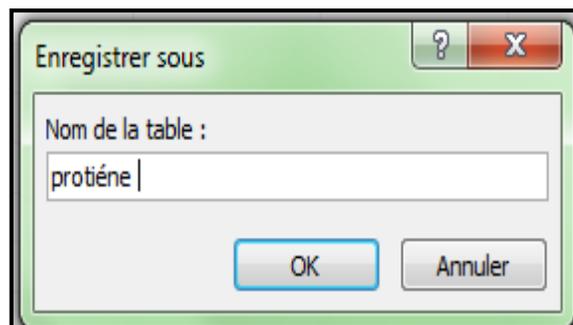
## Chapitre II- Comment créer une base de données ?



- Cliquons sur le 1er bouton de la barre d'outils 'Affichage' pour basculer du 'Mode Feuille de données' au 'Mode Création'. Ce dernier va nous permettre de définir le nom de la 1ère table de notre base de données puis l'intitulé et le type de vos champs (=colonnes).

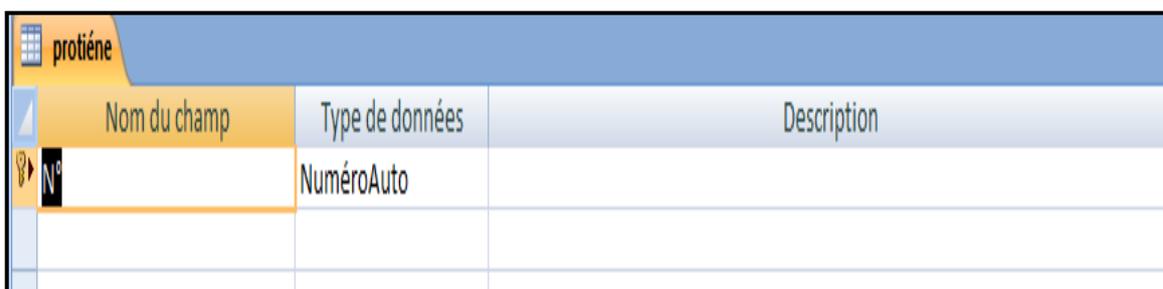


- Donnons le nom « protéine » puis valide en cliquant sur le bouton 'OK'.



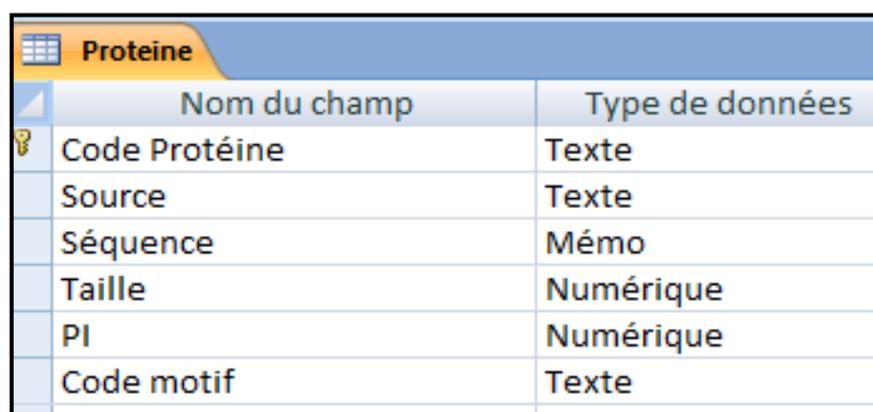
- Attention notre 1<sup>er</sup> champ est la clé primaire de notre table « protéine » c'est grâce à ce champ que nous allons pouvoir lier notre table à d'autres tables par la suite. Ce champ n'accepte pas de doublons par conséquent chaque valeur qui sera entrée par la suite sera unique. La colonne 'Type de données' définit le format des valeurs qui seront entrées dans ce champ comme par exemple des dates. Le champ 'Description' est facultatif laissons le de côté.

## Chapitre II- Comment créer une base de données ?



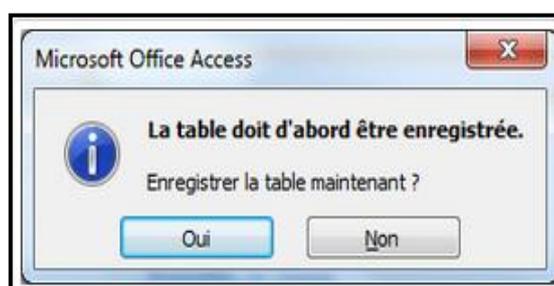
Nom du champ	Type de données	Description
N°	NuméroAuto	

- Entrons les noms de champ suivants ainsi que leur type. Nous constatons que la clé primaire sera un numéro d'identification unique dont le champ se nomme « code » et dont le type de données est 'texte' qui automatiquement va attribuer un numéro à une nouvelle entrée dans la table.



Nom du champ	Type de données
Code Protéine	Texte
Source	Texte
Séquence	Mémo
Taille	Numérique
PI	Numérique
Code motif	Texte

- Repassons maintenant en 'Mode Feuille de données' en cliquant sur le bouton 'Affichage' dans la barre d'outils. Un message nous demande d'enregistrer notre table. Validons en cliquant sur le bouton 'Oui'.



## Chapitre II- Comment créer une base de données ?

- Il faut maintenant saisir des valeurs dans la table. Chaque ligne correspond à un enregistrement. Ne nous préoccupons pas des valeurs du champ elles s'incrémenteront de +1 à chaque nouvel enregistrement.

Proteine						
Code Protéin	Source	Séquence	Taille	Structure 3D	PI	Code motif

- Entrons les enregistrements suivants (Attention le nombre de caractères par champ est limité à 255).

Proteine						
Code Protéin	Source	Séquence	Taille	PI	Code motif	
ADV78063	Treubia lacunosa	MVSENARRSLQE EYRIGQVLGSGGF SVVRRGTSREDGS	529	5.93	PS00007	
AFX97270	Medicago truncatula	VVHQIASGLEAV HRANIVHRDLKPE NCLFLDVRKDSPL	95	4.87	PS00006	
CAO02751	Medicago tornata	QMIMNGNFSFYE KTWKGISQPAKN LISSLLTVDPKRK	243	5.08	PS00001	
CCAMK_ORYSJ	Oryza sativa Japonica	MSKTESRKLSDDY EVVDVLGRGGFSI VRRGVSKSEETQ	516	5.69	PS00016	
ABC70467	Glycine max	RPKGGEKKSTAA MMDFPTWRQVS VSDALLTNEILVM	203	5.11	PS00004	
ADV78065	Pellia epiphylla	MVTKDGSRRRL QDDYIIGQVLGTG GFSVVRKGISRDD	579	6.64	PS00009	
ADV78068	Climacium dendroides	LSSLPEVTRPVVG VFGSMDYVAPEQ LSFANSVLPANDL	290	6.13	PS00008	
ADV78075	Cycas revoluta	KGTRKIDGNAKQ VAIKTLKKVGYGA PGFPGIVPKKGGG	167	6.40	PS00005	
ADV78084	Cercis	KGTKKSSSENTQV AHTLRIGCTSTAD	443	6.21	PS00342	

- Les mêmes étapes pour les autres tableaux (Espèce, Motif, ARNm, Exon ; Intron, Primer F, Primer R, Gene).
- Afin d'établir une relation entre les tables nous allons ajouter un nouveau champ à la table « Motif » ayant une relation avec la table 'Protéine'. Pour cela cliquons sur le bouton 'Affichage' et ajoutons le nom de champ 'code motif' de type texte.

## Chapitre II- Comment créer une base de données ?

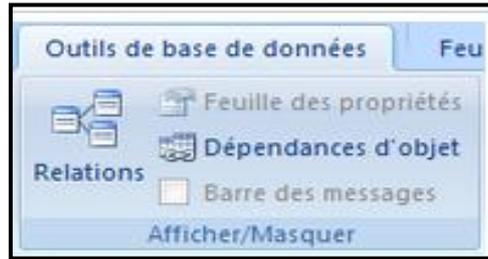
Motif		
	Nom du champ	Type de données
🔑	Code motif	Texte
	Source	Texte
	Séquence	Texte
	Taille	Numérique

- Cliquons sur le bouton 'Affichage' puis enregistrons. Saisissons maintenant les « code protéine » suivants dans notre table 'Motif'.

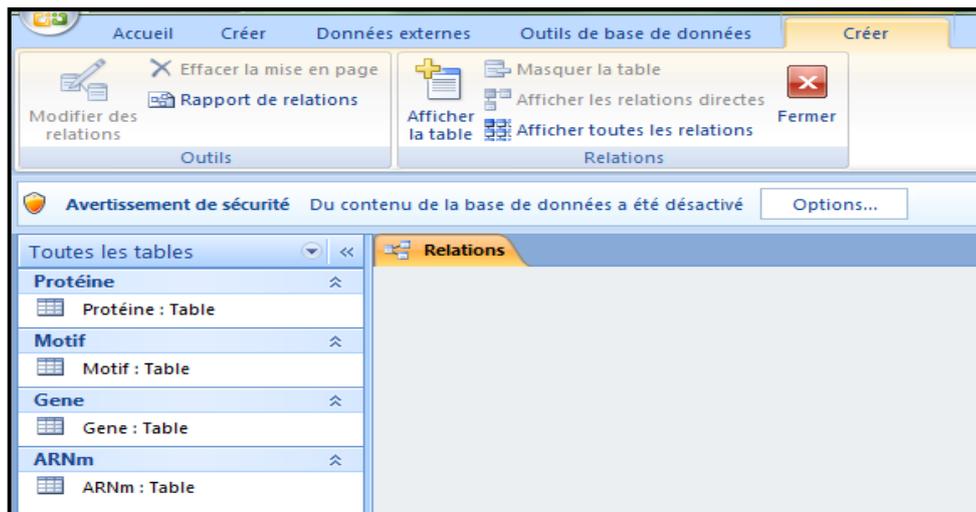
Motif				
	Code motif	Source	Séquence	Taille
+	PS00001	Coffea arabica	NATL	4
+	PS000012	Medicago torn	NFSF	4
+	PS00004	Glycine max	KKsT	4
+	PS00005	Cycas revoluta	TrK	3
+	PS00006	Medicago trun	SgIE	4
+	PS00007	Treubia lacunc	SlqE	4
+	PS00008	Climacium der	GVfgSM	6
+	PS00009	Pellia epiphyll	sGRR	4
+	PS00016	Oryza sativa Ja	RGD	3
+	PS00342	Cercis canader	GKL	3

- On a donc établi une relation entre les tables que on va maintenant définir dans la base de données en cliquant dans la barre de menus sur Outils de base de données puis sur le bouton 'Relations'.

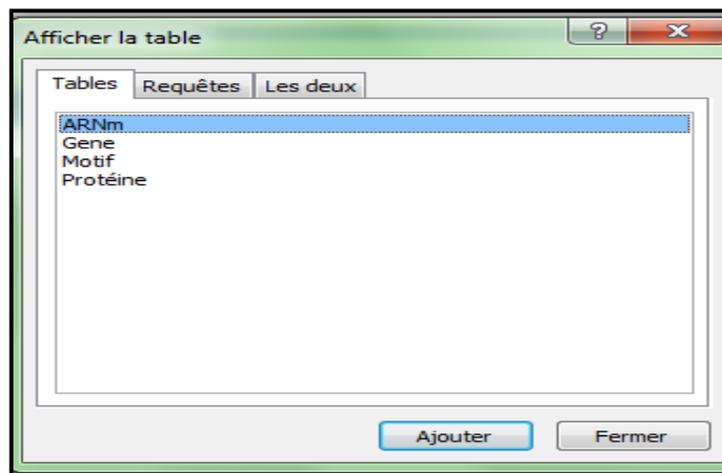
## Chapitre II- Comment créer une base de données ?



- L'onglet 'Relations' apparaît avec une barre d'outils spécifique aux relations.

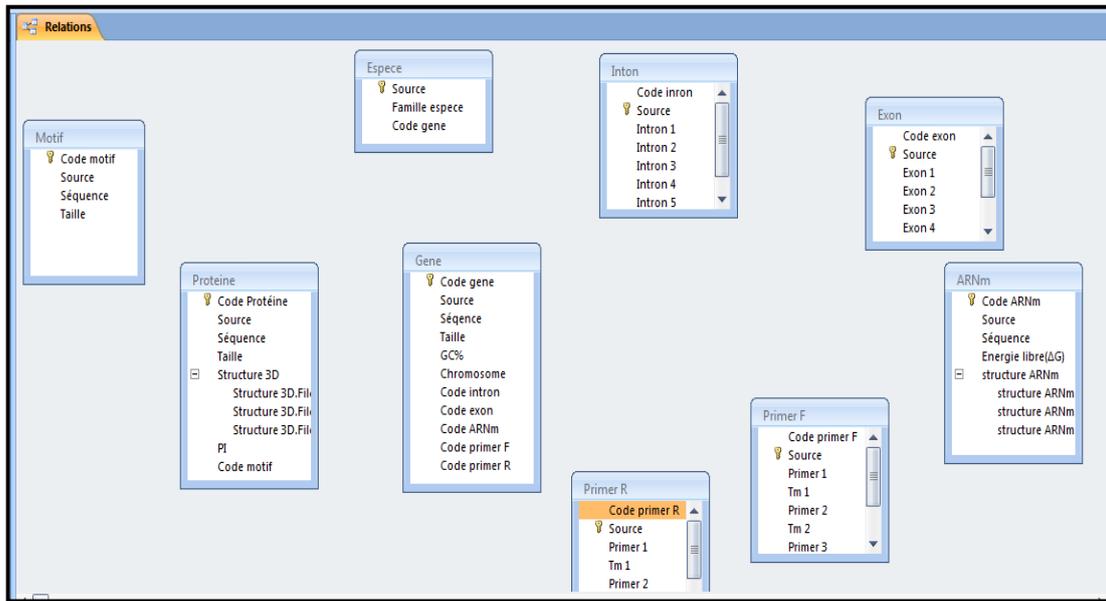


- Cliquons sur le bouton 'Afficher la table' de la barre d'outils la fenêtre suivante apparaît.



- Cliquons sur 'Protéine' puis sur le bouton 'Ajouter' et idem pour 'Motif' la même chose pour toutes les tables puis sur le bouton 'Fermer' les tables apparaissent avec leurs champs respectifs.

## Chapitre II- Comment créer une base de données ?



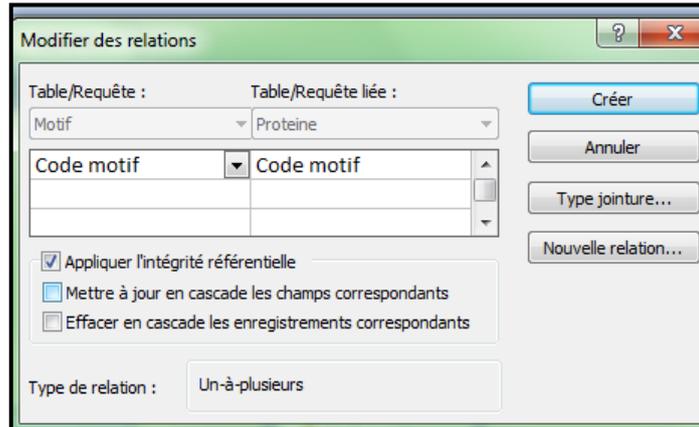
- Maintenons le clic gauche sur le champ 'code' de la table 'Protéine' et glissons le champ vers la table 'Motif' au niveau de ses champs peu importe lequel. Relâchons notre clic gauche la fenêtre suivante apparait.

The 'Modifier des relations' dialog box shows the following configuration:

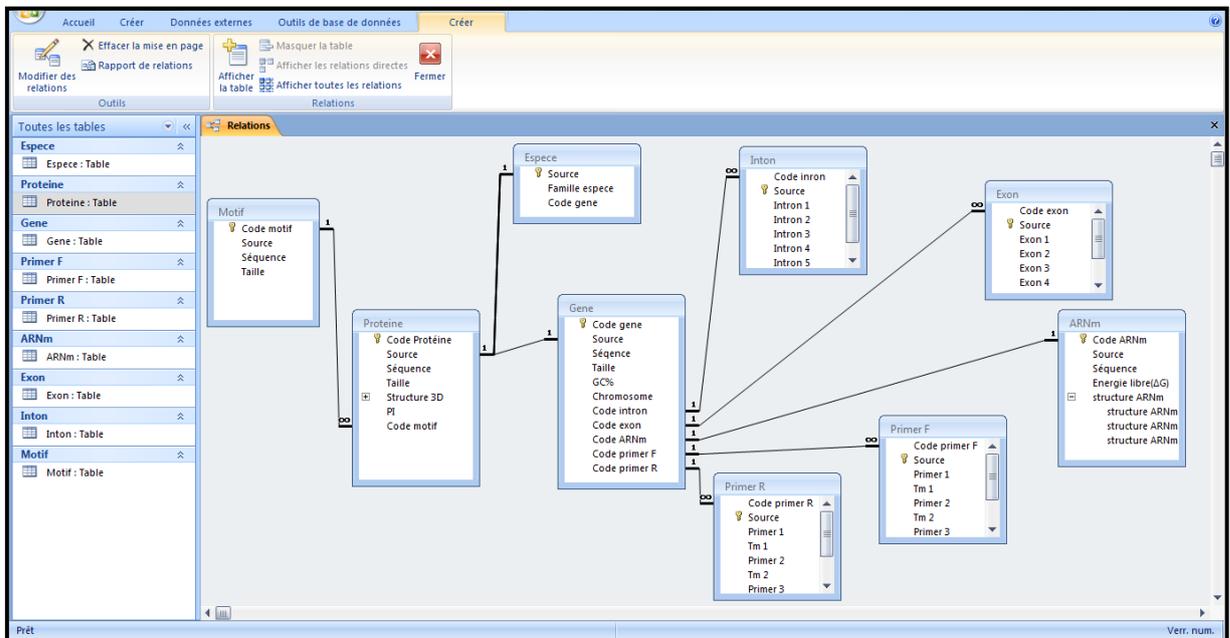
- Table/Requête :** Motif
- Table/Requête liée :** Proteine
- Field mapping:** Code motif (Motif) linked to Code motif (Proteine)
- Options:**
  - Appliquer l'intégrité référentielle
  - Mettre à jour en cascade les champs correspondants
  - Effacer en cascade les enregistrements correspondants
- Type de relation :** Un-à-plusieurs

- Le champ 'Code' de la table 'Protéine' est celui qu'on a glissé à l'étape précédente par contre celui de la table 'Motif' est 'Prénom'. Modifions le champ en cliquant dessus puis en cliquant sur la petite flèche se situant à droite du nom du champ et sélectionnons le champ 'Code Protéine'.
- Cochons 'Appliquer l'intégrité référentielle'. En effet cette option permet d'effectuer un certain nombre de contrôles, pour assurer la cohérence interne de la base de données.

## Chapitre II- Comment créer une base de données ?



- Cochons 'Mettre à jour en cascade les champs correspondants'. Cette option permet de propager les mises à jour d'une table à une autre comme les changements de nom.
- Effacer en cascade les enregistrements correspondants est une option à utiliser avec prudence en effet la suppression d'un élément peut provoquer la suppression de plusieurs autres situés dans l'autre table. Elle est cependant utile selon le contexte. Cliquons sur le bouton 'Créer' nous allons constater qu'un lien est apparu entre les tables.



# *Chapitre III- Base de donnée du gène dmi3*

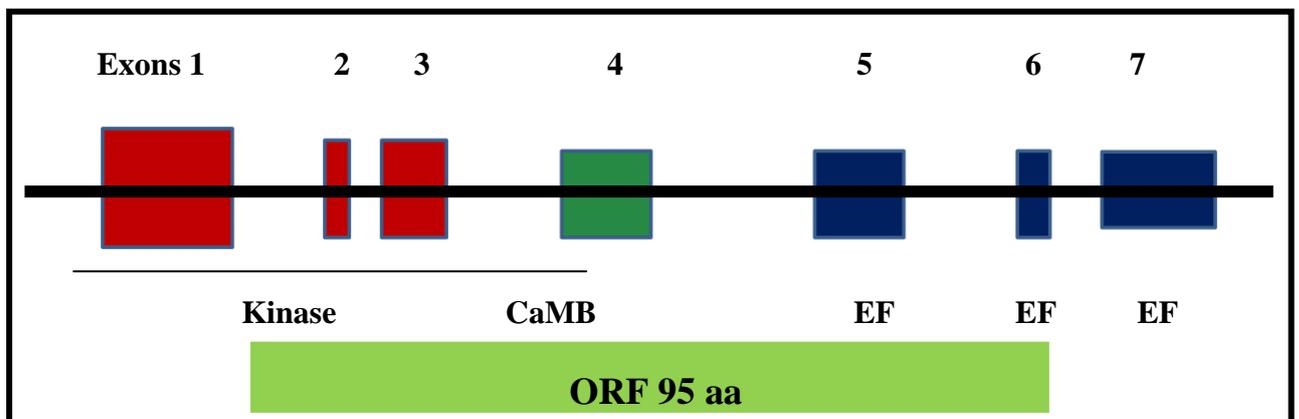
---

### 1. Présentation du gène *dmi3*

Beaucoup de plantes supérieures établissent des relations symbiotiques avec Champignons Mycorhizienne Arbusculaires (CMA) qui améliorent leur capacité à acquérir des éléments nutritifs du sol. Plusieurs gènes impliqués dans la perception et la transduction des signaux symbiotiques mycorhizienne nommés «facteurs Myc» ont été identifiés grâce à des approches génétiques, parmi lesquels on trouve le gène *dmi3* « *Does not Make Infections* »

Le gène *dmi3* code une protéine nucléaire de type Le calcium et calmoduline-dépendante protéine Kinase (CCaMK) (Levy *et al.*, 2004). La structure de cette protéine lui confère une double sensibilité au calcium. Elle possède un domaine C-terminal de type visinine présentant trois mains EF « mains EF », chacune capable de lier un ion calcium libre, et un domaine central auto-inhibiteur pouvant lier la calmoduline, elle-même capable de lier le calcium. Ces deux domaines de sensibilité au calcium régulent le fonctionnement du domaine N-terminal : une sérine/thréonine kinase précédée d'une séquence d'adressage au noyau. Des analyses biochimiques, réalisées chez certains végétaux comme le Lys, ont permis de proposer un mode d'activation pour le *dmi3* (Sathyanarayanan *et al.*, 2000).

Ce gène possède une structure présentant une double sensibilité au calcium et pourrait donc avoir pour rôle de décoder les signatures calciques associées à la mise en place de la Symbiose Mycorhizienne (SM) (**Figure 8**). Ce gène fonctionne de manière cellulaire autonome pour contrôler le processus infectieux dans les symbioses rhizobienne et mycorhizienne (Rival, 2013).



**Figure 8** : Structure du gène *dmi3* chez *M. truncatula*.

### 2. Présentation des tables utilisées pour la création d'une base de données du gène *dmi3*

La base de données créée se compose d'un ensemble des tables, neuf tables dans notre cas (table de protéine, table d'espèces, table d'introns et d'exons...ect) (Figure 9). Les informations concernant le gène *dmi3* ont été tirées de la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) et GenBank (Genetic Codes Databank).

Les résultats obtenus nous renseignent le gène *dmi3* : présence de plusieurs domaines et motifs, nombre d'exons et introns, les amorces utilisées pour l'amplification de ce gène...etc.

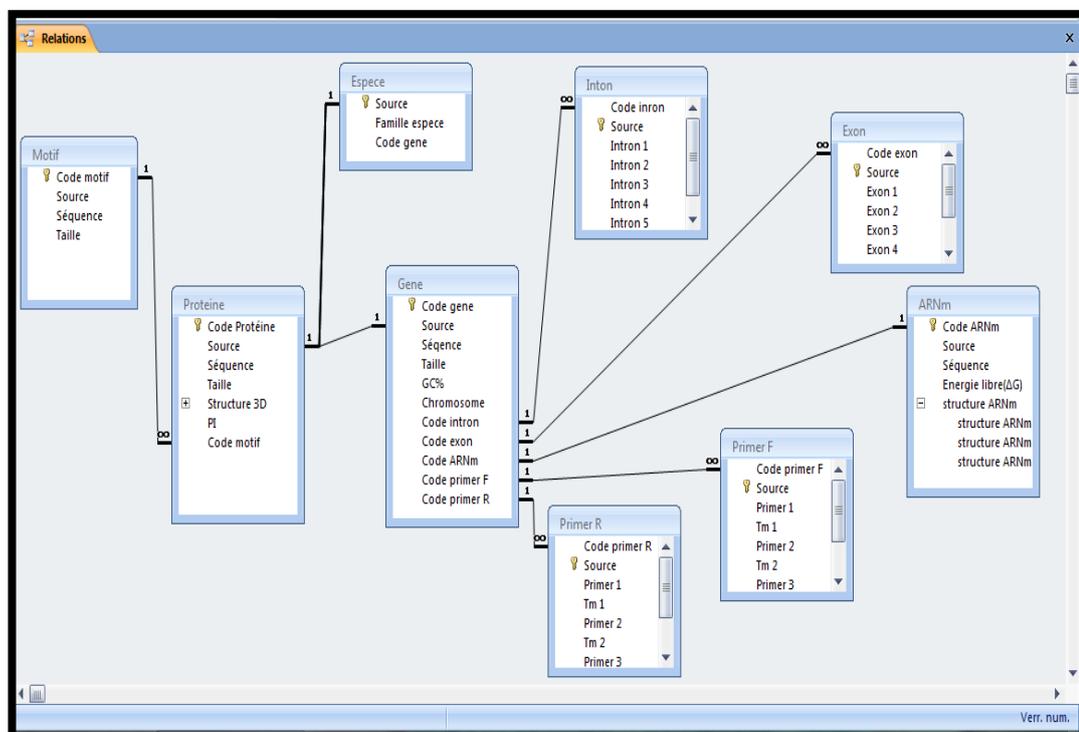


Figure 9 : Tables utilisées pour la création d'une base de données du gène *dmi3*.

#### 2.1. Table d'espèces

Pour la création de la base de données de du gène *dmi3*, nous avons choisi dix espèces appartenant à différents genres et dont le gène *dmi3* a été identifié (Figure 10). : *Climacium dendroides* ; *Coffea arabica* ; *Cycas revoluta* ; *Glycine max* ; *Medicago*

*tornata* ; *M. truncatula* ; *Oryza sativa* ; *Pellia epiphylla* ; *Treubia lacunosa* ; *Cercis canadensis*).

Source	Famille espi	Code gene
Cercis canadensis	Fabacées	FJ913259
Climacium dendroides	Climaciaceae	FJ913238
Coffea arabica	Rubiacées	FJ913261
Cycas revoluta	Cycadaceae	FJ913245
Glycine max	Fabacées	NC_016102
Medicago tornata	Fabaceae	AM501092
Medicago truncatula	Fabaceae	JX468698
Oryza sativa Japonica	Poaceae	138584
Pellia epiphylla	Pelliaceae	FJ913232
Treubia lacunosa	Treubiaceae	FJ913230

Figure 10 : Table des espèces étudiées.

## 2.2. Table d'introns et d'exons

Nous résultats obtenus montrent que le *dmi3* n'est pas identique chez toutes les espèces étudiées n'est pas identique chez toutes les espèces. Sa structure comprend un seul exon et aucun intron chez *C. dendroides* ; *T. lacunosa* ; *C. revoluta* ; *G. max* et *P. epiphylla*, tandis que les trois espèces *M. truncatula*, *C. arabica* et *C. canadensis* possèdent sept exons et six introns, et d'autre part *O. sativa* et *M. tornata* elles ont cinq et six exons et quatre et cinq introns respectivement (**Figure 11**).

## 2.3. Table de motifs

Pour les protéines, un motif de séquence se distingue d'un motif structurel, un motif formé par la disposition tridimensionnelle d'acides aminés qui peuvent ne pas être adjacente. Cette protéine DMI3 possède des motifs dissemblables (**Figure 12**); nous avons des espèces portent quatre motifs différents comme, *M. truncatula* (SglE) ; *C. arabica* (NATL) ; *M. tornata* (NFSF) ; *G. max* (KKsT) ; *P. epiphylla* (sGRR) ; *T. lacunosa* (SlqE), et d'autres espèces portent que trois motifs et c'est le cas de *C. revoluta* (TrK) ; *O. sativa* (RGD) ; *C. canadensis* (GKL). La plante *Climacium dendroides* comporte six motifs (GVfgSM).

## Chapitre III – Base de données du gène *dmi3*

Exon							
Source	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7
Cercis canadensis	AAAAGGAACC AAAAAATCAA GCAGTGAAAA	G TATCCACCTT TCATTGCTCA GAATAATCGC	G GGAATTTGAG TTTTTATGAG AAGACTTGGA	CTTC TGTGTCATCC ATGGGTCAGA GGTGACATAG	A TGTGCAAATG GAGRCAATGC CACTCTCTCT	ATGTA TGACACAGAT CGATCCGGTT GCATCACTAA	GCTTT GCCAGAAG TGCCITCCAG CTGATATCAC
Climacium dendroides	ATTAAGCTCC CTGCCAGAAG TCACACGACC						
Coffea arabica	AAGAGGGATA AGAAAATCCA GTGGTGGTAA	G TATCCGCTT TTATAGCACA ATCAACTAGG	GGAT ACTTCAGCT TCACGAAAAA ACATGGAAAGA	GTTCTCAA CATCCTGGG TTACTGGGGA	ATG CACGAACGGT GAGAATGCCA CATTATCTCA	A TGTACGACAC AGACCGGTCA GGATGCATCA	GCATTACCT GATGACTGCC TTCCGGTGGGA
Cycas revoluta	AAAAGGAACC CGCAAAATAG ATGGAAATGC						
Glycine max	AGACCCAAAG GTGGAGAGAA GAAGAGCACA						
Medicago tornata	CAA ATGATAATGA AT	GGGAATTTTA GTTTTATGA GAAGACTTGG	CT TCTAAGTGAT CCATGGGTGA AAGGTGAAAA	ATGTGC AGATAGAGAC AATGCAACTC	GATGTATGAT ACAGATAGAT CAGGCTGCAT	GCTTTGC CATATGATTG TCTTCCAAT	
Medicago truncatula	ATGGGATATG GAACAAGAAA ACTCTCAGAT	GTAT CCACCTTTCA TTGCCAAAAA TAATCGCCAA	G GGAATTTTATG TTTTTATGAG AAGACTTGGA	C TTCTAAGTGA TCCATGGGTC AAAGGTGAGA	ATGTGCA GATAGAGACA ATGCAACTCT	ATGT ATGATACAGA TAGATCAGGC	GC TTTGCCATAT GATTGTCTTC CAACTGATAT
Oryza sativa Japonica	ATGGCTCCC ACCAAGAAGG	AAGAA GAGCACGGAC	GGAA GCTGATTATC CTTGCAAACA	ACAATGT TGATCTTGGGA	GTGACTCGGA CATCATCAAC		

Intron						
Source	Intron 1	Intron 2	Intron 3	Intron 4	Intron 5	Intron 6
Cercis canadensis	GTAACCTG CTACTTTAAG TTCTTCAATT	GTAAGT GATACACATC TCATATGGAT	GTATGTCATA CTCTTACCTA CTTCATCGGA	G TAAGTAGCTG TTTAATTCAA TAGATAAAGC	GTA AACTCTTTTT ATAGCTCATC TAGTYCTTTT	GTAAT TCACTTCCCT TCTCTAATTT
Climacium dendroides						
Coffea arabica	GT ATGTTAACTA ACTTCGGGCA GTGATGTTTT	GTGGGT CTTCTGTGA TTGTATATCT	GTC TGATCTGAAA TAGGTTAAGC ACAGTTAAT	GTAAGT CACCAAACCT TGTTTCAAAA	GTATA TTAATTTTCTAG ATGCCAATGA	G TAACCTCTT CTCTTTTCCA TCCACAAGCT
Cycas revoluta						
Glycine max						
Medicago tornata	GTAAGTAC AATCTATTAC AGAATATAGA	GTATTGTAC ACTACTACTA TCCTCATTTT	GTAAGTACC CCAAAAGTAA AAAATTATCA	GTAAGTACC CCAAAAGTAA AAAATTATCA	GATGTATGAT ACAGATAGAT CAGGCTGCAT	
Medicago truncatula	GTATGTTTT TACTTTTCTT TCTTTCTTAT	GTAAGTACC ATCTCTTACA GAATATAGAA	GTATTGTACA CTACTACTAT CTTGAACATA	GTAAGTAC CCAAAAGTCA AAAATTATCA	GTGAATTAT ACTCAACACC CAAACAAATA	GTA TGCACACACA TCTCAATTAA
Oryza sativa Japonica	GTAAGGTT CCTGATCGAT	GTATCGATC CCGACCGATT	GT AAGTTTGT CATCTTCCG	GTTCTGTCG CTACCGACAT		

Figure 11 : Table d'introns et d'exons du gène *dmi3*.

Motif				
	Code motif	Source	Séquence	Taille
+	PS00001	Coffea arabica	NATL	4
+	PS000012	Medicago torn	NFSF	4
+	PS00004	Glycine max	KKsT	4
+	PS00005	Cycas revoluta	TrK	3
+	PS00006	Medicago trun	SgIE	4
+	PS00007	Treubia lacunc	SlqE	4
+	PS00008	Climacium der	GVfgSM	6
+	PS00009	Pellia epiphyll	sGRR	4
+	PS00016	Oryza sativa Ja	RGD	3
+	PS00017	Gossypium hirs	GKI	3

Figure 12 : Table de motifs de la protéine DMI3.

#### 2.4. Table de primers

Les « primers » ou « amorces » sont de courtes séquences d'acide nucléique (généralement environ 10 paires de bases) qui servent de point de départ pour la synthèse de l'ADN. La base de données nous fournit des renseignements concernant les primers de *dmi3*.

On a trouvé quatre primers « R : reverse » et quatre primers « F : forward » différents les uns des autres et dont la température de fusion est comprise entre 59.80 C<sup>0</sup> et 60.23 C<sup>0</sup> (Figure 13).

#### 2.5. Table de gène

Le pourcentage de la Guanine et de la Cytosine GC (% GC) du gène *dmi3* a été calculé sur le site internet « <http://endomemo.com/bio/gc.php> ». Les résultats montrent que le % GC n'est pas semblable chez toutes les espèces (Figure 14). L'espèce qui a le plus grand pourcentage est *C. dendroides* avec 53.50% de GC, et l'espèce qui a le plus petit pourcentage est *M. tornata* avec 29.12 % de GC. Les autres espèces étudiées contiennent un % GC situé entre 48.44 % et 32.77 %. Le gène *dmi3* chez *G. max* est situé sur le chromosome 15 tandis que chez *O. sativa* il est situé sur le chromosome 5 et sur le chromosome 8 chez *M. truncatula*. La localisation chromosomique de ce gène n'a pas été encore identifiée chez les autres espèces (Figure 14).

### Chapitre III – Base de données du gène *dmi3*

Primer F										
Code prime	Source	Primer 1	Tm 1	Primer 2	Tm 2	Primer 3	Tm 3	Primer 4	Tm 4	
F1	Cercis canader	TCACCACCATT	59.92	GAGGACTCAA	59.90	TGAGGACTCA	59.90	GAGGACTCAA	59.90	
F2	Climacium der	AAGGAGCTCA	59.95	GGTGTACTGC	59.84	AAGGAGCTCA	59.95	CAAGCAGATG	59.95	
F3	Coffea arabica	CCTGGGTTAC	60.05	CGTGACTGCTC	60.02	GGCAAATTGCT	60.07	GGCAAATTGCT	60.07	
F4	Cycas revoluta	GAACCCGCAA	59.90	GATGGAAATG	60.08	GCCAAAGAAA	59.67	CCAAAGAAAG	59.67	
F5	Glycine max	GATGCCTTGCT	59.81	TACCAATCCC	59.78	ATTCCCACAT	59.78	TCGCCAGATG	59.94	
F6	Medicago torn	GTCGGAAATCC	59.80	CAACAACCGTC	60.00	GTCGGAAATCC	59.80	GCATGGATGCT	60.08	
F7	Medicago trun	ACCTGAGGCTC	60.00	TTGTATGAATC	59.25	CCTGAGGCTCT	59.16	TCACCTGAGGC	60.12	
F8	Oryza sativa Ja	TGCCAAATTC	59.91	TAAATGCATGC	59.85	TAAATGCATGC	59.85	GAATAAATGC	59.81	
F9	Pellia epiphyll	GAGCTGGCCTC	60.12	TTTGGTTTGG	60.09	ACATTGATGGC	60.10	ATTCTTGCTGG	60.07	
F10	Treubia lacunc	TTGGACGTTTT	60.05	GGATTGCGCTT	60.02	GGATTGCGCTT	60.02	GGATTGCGCTT	60.02	

Primer R										
Code prime	Source	Primer 1	Tm 1	Primer 2	Tm 2	Primer 3	Tm 3	Primer 4	Tm 4	
R1	Cercis canader	TACGAAGCAG	59.91	AGGAGCATCC	60.20	AGGAGCATCC	60.20	AGCATCTCCC	59.80	
R2	Climacium der	CACGCAAGTC	60.02	GCTGGCAGGT	60.01	TGAGAACACG	59.83	CACGGGTGGG	60.23	
R3	Coffea arabica	GGATCCGACC	59.87	ATCAAACAAC	59.82	GTCCTGGGAA	59.84	TGCTCTGGGAA	59.84	
R4	Cycas revoluta	ATGCATCGGAT	59.74	GGGGAGAAAC	60.31	AGTTCAGCAC	60.16	AGTTCAGCAC	60.16	
R5	Glycine max	GCGTGGGACA	59.98	GCAAGTGCCTA	60.01	GCGTGGGACA	59.98	TGGATCCAAA	59.79	
R6	Medicago torn	TGGCTTTTCA	60.09	CACAAACGAA	59.71	CCTTTCACCCA	59.78	AAAGGGCCGT	59.45	
R7	Medicago trun	CGAAATCACA	60.02	TCGGCGCTATT	60.36	CGAAATCACA	58.71	CGAAATCACA	60.02	
R8	Oryza sativa Ja	ATCCTTGACGC	60.12	TAGGCGACTTA	60.10	CCCATCGACAC	60.10	TAGGCGACTTA	60.10	
R9	Pellia epiphyll	GAAGGGTTG	59.97	CCAAAATTGCC	60.07	CCAAAATTGCC	60.07	CTGCTTTGCCA	59.86	
R10	Treubia lacunc	TGATTTTCAA	60.02	TTTTTGTTC	59.95	GAGGATACCC	60.07	TTCTCCGGTT	60.11	

Figure 13 : Tables de primers du gène *dmi3*.

Gene					
	Source	Séquence	Taille	GC%	Chromosome
+	Oryza sativa Japonica	GGCTTCAGGCGGTTGTGGA AGTAGCGCTTGCATTTTGAG	138584	44.61	chromosome 5
+	Pellia epiphylla	ATGGGTGACAAAGGATGGCA GCGGCAGACGCACGCTGCA	1740	48.44	aucun
+	Glycine max	TATAATGCCAGCAGTTGAC TCTCTCTTTGTCCCTTCCAGA	5030	34.57	chromosome 15
+	Medicago tornata	TTCTAGGTAGAGGTGGATTT TCTGTTGTTAGAAAAGGTA	3131	29.12	aucun
+	Treubia lacunosa	ATGGGTGAGTGAGAATGCGA GGCGGTCCTTGCAAGAGGA	1590	46.98	aucun
+	Climacium dendroides	ATTAAGCTCCCTGCCAGAA GTCACACGACCGGTGGTGG	871	53.50	aucun
+	Cycas revoluta	AAAAGGAACCCGCAAAAT AGATGGAAATGCAAAGCA	502	44.62	aucun
+	Cercis canadensis	AAAAGGAACCAAAAAATC AAGCAGTGAAAATACTCAG	2726	37.45	aucun
+	Coffea arabica	AAGAGGGATAAGAAAATC CAGTGGTGGTAAAATTCAA	3332	36.61	aucun
+	Medicago truncatula	GTGGTTTCATCAAATAGCTTC AGGGTTAGAAGCTGTTTCAT	534	32.77	chromosome 8

Figure 14 : Table du gène *dmi3* présentant sa taille, sa localisation chromosomique et son pourcentage en GC.

## 2.6. Table de protéine

Touts les protéines ont un pHi ou PI. Le pI d'une protéine est le pH pour lequel les charges positives compensent les charges négatives. A ce pH, la somme des charges ou la charge globale pour tous les acides aminés est nulle, autrement dit, le pH pour lequel la molécule est électriquement neutre.

Pour la protéine DMI3 on a calculé le pHi sur ce site internet « [http://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool) ». D'après les résultats obtenus on observe que chez toutes les espèces la valeur de pHi est située entre 4.87 et 6.64. La plus grande valeur a été notée chez *P. epiphylla* (6.64) et la petite valeur chez *M. truncatula* (5.08). On observe aussi une différence au niveau des acides aminés comme par exemple chez *T. lacunosa*, la protéine DMI3 est composée de 529aa tandis que chez *C. dendroides* on en trouve 290 (**Figure 15**).

Code Protéine	Source	Séquence	Taille	PI	Code motif
ADV78063	Treubia lacunosa	MVSENARRSLQE EYRIGQVLGSGGF SVVRRGTSREDGS	529	5.93	PS00007
AFX97270	Medicago truncatula	VVHQIASGLEAV HRANIVHRDLKPE NCLFLDVRKDSPL	95	4.87	PS00006
CAO02751	Medicago tornata	QMIMNGNFSFYE KTWKGISQPAKN LISSLLTVDPKRP	243	5.08	PS00001
CCAMK_ORYSJ	Oryza sativa Japonica	MSKTESRKLSDDY EVVDVLGRGGFSI VRRGVSKSEKTO	516	5.69	PS00016
ABC70467	Glycine max	RPKGGEKKSTAA MMDFPWTRQVS VSDALLTNEILVM	203	5.11	PS00004
ADV78065	Pellia epiphylla	MVTKDGSRRRL QDDYIIGQVLGTG GFSVVRKGISRDD	579	6.64	PS00009
ADV78068	Climacium dendroides	LSSLPEVTRPVVG VFGSMDYVAPEQ LSFANSVLPANDL	290	6.13	PS00008
ADV78075	Cycas revoluta	KGTRKIDGNAKQ VAIKTLKKVGYGA PGFPGIVPKKGGG	167	6.40	PS00005
ADV78084	Cercis canadensis	KGTKKSSSENTQV NKTLDNCTSTAN	443	6.21	PS00342

**Figure 15 :** Table de la protéine DMI3 présentant le nombre d'acides aminés et le PI.

# *Conclusion générale*

---

## Conclusion générale

---

La grande majorité des végétaux terrestres s'associent avec de nombreux organismes du sol parmi lesquels on trouve les Champignons Mycorhiziens (CM). Ces derniers jouent un rôle primordial. Cette interaction très répandue implique des échanges de nutriments *via* des structures spécialisées produites par le champignon dans les cellules corticales des racines, appelées « arbuscules ». En échange de sucres fournis par la plante, le champignon apporte à sa plante hôte de l'eau, et des éléments nutritifs essentiellement le phosphore et améliorant ainsi sa nutrition et sa croissance.

La reconnaissance de la plante-hôte par le champignon mycorhizien arbusculaire se fait grâce à des molécules présentes dans les exsudats racinaires et fongiques. Il s'agit de l'hormone « strigolactone » et des « facteurs Myc », induisant l'expression des plusieurs gènes tels que : *dmi1*, *dmi2* et *dmi3* (*doesn't make infections*).

La protéine codée par le gène *dmi3* est localisée dans la région nucléaire des racines là où les oscillations calciques s'opèrent. Quelques protéines impliquées dans les étapes précoces de la signalisation symbiotique ont aussi une localisation nucléaire comme : NSP2 (Parniske, 2008 ; Oldroyd et Ding., 2009).

Des études ont montré que l'un des gènes de la voie de signalisation symbiotique (Légumineuses/*Rhizobium*) est aussi nécessaire à la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. En effet, chez un mutant *dmi3*, les hyphes du CM parcourent la surface de la racine en formant de nombreux appressoria qui ne parviendront pas à pénétrer la couche épidermique (Rival, 2013).

La protéine DMI3 possède une structure présentant une double sensibilité au calcium, et perçoit les variations de concentration en calcium. Cette dernière est activée par l'autophosphorylation de son domaine kinase. De plus, *dmi3* exerce un rétrocontrôle négatif sur *dmi1* et *dmi2*, et donc sur les oscillations calciques (Miwa *et al.*, 2006).

DMI3 agit de façon autonome, en permettant la pénétration des hyphes uniquement dans les tissus où le gène est exprimé. Ainsi, ce gène contrôle l'infection dans la symbiose mycorhizienne et aussi décode les signatures calciques associées à leurs mises en place.

L'objectif du travail élaboré est de créer une base de données du gène *dmi3*. Cette dernière est composée de neuf tables (table d'espèce, table de protéine, table de gène,

## *Conclusion générale*

---

tables de primers « F », tables de primers « R », tables d'exons, tables d'introns, tables d'ARNm et tables de motifs). D'après les résultats obtenus, on conclue que le gène *dmi3* n'est pas identique chez toutes les espèces végétales même si ces espèces sont de la même famille. En termes de taille, chaque espèce a une taille différente de l'autre.

*Références  
bibliographiques*

---

- **Accart, J.P.** 1994. Les banques de données: historique et production. *Le Micro-Bulletin du CNRS*. **56** : PP. 104-111.
- **Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H.** 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*. **435** (7043): PP. 824-827.
- **Akiyama, K., and Hayashi, H.** 2006. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany (London)*. **97** (6): PP. 925-931.
- **Béreau, M., Louisanna, É., Grandcourt, A., and Garbaye, J.** 2003. Symbiose mycorrhizienne et nutrition minérale. PP. 74.
- **Besserer, A., Puech-Pages, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy S., Portais, J.C., Roux, C., Becard, G., and Sejalon-Delmas, N.** 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*. **4** (7): PP. 226.
- **Boullard, B.** 1990. Guerre et paix dans le règne végétal. *Edition marketing*, p. 336.
- **Bouwmeester, H.J., Matusova, R., Zhongkui, S., and Beale, M.H.** 2003. Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. **6** (4): PP. 358-364.
- **Bouwmeester, H.J., Roux C., Lopez-Raez, J.A., and Bécard, G.** 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science*. **12** (5): PP. 224-230.
- **Bucher, M.** 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *The New Phytologist*. **173**: PP. 11-26.
- **Darmont, J.** 2004. Base de données. PP. 03.
- **Dechamplain, N.** 2002. Mycorhization . *PISTES/Université Laval*. PP. 03.
- **Delaux, P.M.** 2011. Rôles des strigolactones et évolution des compétences mycorrhiziennes dans la lignée verte. PP. 29.
- **Delaux, P.M., Bécard, G., and Combier, J.P.** 2013. NSP1 is a component of the Myc signaling pathway.
- **Demars, B.D., and Broener, R.E.J.** 1995. A simple method for observing VAM with suggestions for designing class activities. *J. of Biological Education*. **29** (3): PP. 209-214.

- **Elmalyani, A., and Elidrissi, T.** 2013. Le rôle des mycorhizes dans la nutrition phosphatée et azotée de certaines légumineuses : cas du pois chiche. PP. 10.
- **Gianinazzi-Pearson, V.** 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant cell*. **8**: PP. 1871-1883.
- **Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernie, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J. B., Sun, J., Bano, S.A., and Ratet, P.** 2012. A GRAS-Type Transcription Factor with a Specific Function in Mycorrhizal Signaling. *Curr Biol*.
- **Guether, M., Neuhauser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U., and Bonfante, P.** 2009. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol* **150**: PP. 73-83.
- **Guinberteau, J., and Courtecuisse, R.** 1997. Diversité des champignons (surtout mycorrhiziens) dans les écosystèmes forestiers actuels. PP. 28.
- **Hamza, N.** 2014. Application des mycorhizes arbusculaires en culture maraîchère cas de la pastèque (*Citrullus lanatus*). PP. 09.
- **Harley, E. and Harley, J.** 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytol* **105** : PP. 1–102.
- **Harley, J.L., and Smith, S.E.** 1983. Mycorrhizal Symbiosis. *Academic Press, Londres*. PP. 483.
- **Harrison, M.J., Dewbre, G.R., and Liu, J.** 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: PP. 2413-2429.
- **Hérault, S.** 2009. Analyser et valoriser un système d'information documentaire interne : vers l'utilisation de schémas de métadonnées .Le cas des bases de ressources de Centre INFFO Centre pour le développement de l'information sur la formation permanente. PP. 27.
- **Javot, H., Penmetsa, R.V., Terzaghi, N., Cook, D.R., and Harrison, M.J.** 2007a. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: PP. 1720-1725.

- **Lauressergues, D., Delaux, P.M., Formey, D., Lelandais-Brière, C., Fort, S., Cottaz, S., Bécard, G., Niebel, A., Roux, C., and Combiér, J.P.** 2012. The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2.
- **Levy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ane, J.M., Lauber, E., and Bisseling, T.** 2004. A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulindependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**: PP. 1361-1364.
- **Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., and Niebel, A.** 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*. **469**: PP. 58-63.
- **Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** 2006. Analysis of Nod-factorinduced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact.* **19**: PP. 914-923.
- **Morton, J.B.** 1993. Problems and solutions for the integration of Glomalean taxonomy, systematic, biology and the study of endomycorrhizal phenomena. *Mycorrhiza*. **2**: PP. 97-109.
- **Mount, D.** 2004. Access xp étape par étape créé application de base de données. El maarifa. ISBN: 9961-48-116-X. *El-Souna, Alger*. PP. 234.
- **Mousain, D., Matumoto, P., Pintro, and Quiquampoix, H.** 2013. Le rôle des mycorrhizes dans la nutrition phosphatée des arbres forestiers. PP. 68.
- **Nagahashi, G., and Douds, D.D.** 1997. Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* **136**: PP. 299-304.
- **Navazio, L., Moscatiello, R., Genre, A., Novero, M., Baldan, B., Bonfante, P., and Mariani, P.** 2007. A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiology*. **144** (2) : PP. 673-681.
- **Newman, E., and Reddell, P.** 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New phytologist*. PP. 106.
- **Oldroyd, G.E., and Ding, Y.** 2009. Positioning the nodule, the hormone dictum. *Plant Signal. Behav.* **4**: PP. 89-93.

- **Parniske, M.** 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews. Microbiology*. **6**: PP. 763-775.
- **Poulsen, K.H., Nagy, R., Gao, L.L., Smith, S.E., Bucher, M., Smith, F.A., and Jakobsen, I.** 2005. Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant.
- **Ravat, F., Zurfluh, G.** 1995. Répartition d'un schéma conceptuel de bases de données orientées objet. *Nancy (France)*. BDA. **95**: PP. 145-163.
- **Read, D.J.** 1991. Mycorrhizia in ecosysteme. *Experientia*. **47**: PP. 376-391.
- **Redon, O.P.** 2009. Rôle de champignons mycorrhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*). PP. 28.
- **Rival, P.** 2013. Coordination entre l'épiderme et le cortex dans l'établissement des endosymbioses racinaires chez *Medicago truncatula* : rôle du gène *dmi3* codant une protéine kinase calcium et calmoduline dépendante. PP. 64.
- **Sanders, I.R., Clapp, J.P., and Wiemken, A.** 1996. The Genetic diversity of AM fungi in natural ecosystems a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New phytol.* **13**: PP. 123-134.
- **Sathyanarayanan, P.V., Cremo, C.R. and Poovaiah, B.W.** 2000. Plant chimeric Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase. Role of the neural visinin-like domain in regulating autophosphorylation and calmodulin affinity. *J Biol Chem* **275**: PP. 30417-30422.
- **Selosse, A., and Le Tacon, F.** 1997. Des mycorhizes à l'origine de la flore terrestre. *J. Bot. Soc.bot. Fr.* **3**: PP. 21-25.
- **Sieverding, E.** 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems, GTZ. **224**: PP. 371.
- **Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C., and Lafonde, M.** 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*. **363**: PP. 67-69.
- **Strullu, D.G.** 1990. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. *Collection TEC and DOC, Lavoisier, Paris*. PP. 250.
- **Strullu, D.G.** 1991. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées, Technique et Documentation. *Lavoisier, 3ème Edition. Paris*. PP. 250.

- **Takeda, N., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Parniske, M.** 2009. Apoplastic plant subtilases support arbuscular mycorrhiza development in *Lotus japonicus*. *Plant J.* **58**: PP. 766-777.
- **Takeda, N., Haage, K., Sato, S., Tabata, S., and Parniske, M.** 2011. Activation of a *Lotus japonicus* subtilase gene during arbuscular mycorrhiza is dependent on the common symbiosis.
- **Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Bécard, G., and Franken, P.** 2003. Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from a symbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology.* **131** (3): PP. 1468-1478.
- **Tisdall, J.M., and Oades, J.M.** 1979. Stabilization of soil aggregates by the root segments of rye grass. *Aust. J. Soil Res.* **17**: PP. 429-441.
- **Wang, B., and Qiu, Y.L.** 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: PP. 299-363.
- **Wang, E., Schornack, S., Marsh, J.F., Gobbato, E., Schwessinger, B., Eastmond, P., Schultze, M., Kamoun, S., and Oldroyd, G.E.** 2012. A Common Signaling Process that Promotes Mycorrhizal and Oomycete Colonization of Plants. *Curr Biol.*

# La voie de signalisation « myc » : création d'une base de données du gène *dmi3*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie et Génétique végétales

## Résumé :

On estime que plus de 80% des végétaux interagissent avec des champignons. Cette association symbiotique apporte à la plante des éléments nutritifs, essentiellement le phosphore, utile à sa croissance, et d'autre part, renforce ses défenses naturelles vis-à-vis de stress d'origine biotique ou abiotique. L'interaction débute par un échange de signaux entre les deux partenaires où les molécules symbiotiques clés sont des « strigolactones » sécrétées par le partenaire végétal, et des « facteurs Myc » produits par le champignon. La reconnaissance de ces signaux moléculaires déclenche une cascade de signalisation dans les cellules racinaires qui implique plusieurs gènes aboutissant à la mycorhization. Parmi ces gènes, on cite *dmi3/ccamk* codant une protéine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline. L'objectif de notre travail est de créer une base de données du gène *dmi3* contenant toutes les informations concernant ce gène chez différentes espèces appartenant à différentes familles. Les résultats montrent que le gène *dmi3* diffère d'une espèce à une autre et même au sein de la même famille.

**Mots clés :** mycorhization, facteurs « Myc », signaux moléculaires, *dmi3*, base de données.

## Jury d'évaluation :

**Président du jury :** *KELLOU Kamel* (M.A.A - UFM Constantine),  
**Encadrante :** *BENABDOUN Faiza Meriem* (M.C.B - UFM Constantine),  
**Examineur :** *HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid* (Professeur - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 16/06/2016