



UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

DEPARTMENT DE GENIE DES PROCÉDES

N° D'ORDRE : M.../ 2011

MEMOIRE

Présenté pour obtenir

LE DIPLOME DE MAGISTER

SPECIALITE : CHIMIE

OPTION : CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT

Par

M^{elle} BENALIOUA BAHIA

**ETUDE BIOINFORMATIQUE ET DOSAGE
CHIMIQUE DES TANINS PRODUIT PAR LES
PLANTES MEDICINALES EXPOSEES AU STRESS DE
LA POLLUTION**

Soutenu le **05/05 /2011** devant le jury composé de :

Président :	F.ABDELMALEK	Professeur	Université de Mostaganem
Examineurs :	A. DJELLOUL	Maître de Conférences A	Université de Mostaganem
	R. M. GHEZZAR	Maître de Conférences A	Université de Mostaganem
Rapporteur :	F.TALEB	Maître de Conférences A	Université de Mostaganem

Résumé

Nous avons exposés trois espèces différentes de plantes (le basilic, le thym, et le persil) à quatre genres de stress (le froid, l'obscurité, eau saline, eau mazoutée), et nous avons laissés une plantes de chaque espèce comme témoins. Ceci va provoquer une sécrétion des tanins. Nous avons étudiés la réponse génétique et biochimique de ces plantes. Tout d'abords nous avons fait une étude bioinformatique pour identifier le motif (AAA(C) X_n (A/C/G) CGCG (C/G/T) n ≤ 18) (consensus Taleb-Fromm) dans la région promotrice des gènes responsables à la biosynthèse des tanins, puis nous avons fait une étude microbiologique pour confirmer ce que nous avons trouvés théoriquement.

Dans l'étude bioinformatique nous avons localisés le motif cherché dans la région promotrice des gènes codant pour l'enzyme de l'anthocyanidine synthase, ainsi que l'anthocyanidine réductase. Ces enzymes jouent un rôle dans la biosynthèse des tanins.

Le test microbiologique a montré que les extraits des plantes stressées ont un effet bactéricide important par rapport à celles qui sont à l'état normal (non stressé). Les extraits de basilic stressé ont une zone d'inhibition plus importante avec S.aureus qu'avec E.coli. Pour le persil et le thym nous avons remarqués le contraire c-à-d les zones d'inhibition ont été plus importante avec E.coli qu'avec S.aureus, cela veut dire que le pouvoir antibactérien augmente lorsque les plantes subissent des stimuli.

Nous avons conclu que lors d'un stress, il y aura une réponse génétique par des réactions enzymatiques qui se traduit par la biosynthèse des tanins et d'autres éléments connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Mots clés : bioinformatique, stress, tanins, dosage chimique.

Abstract

We exposed three species different of plants (basil, thyme, and the parsley) to four kinds of stress (the cold, darkness, water salt works, polluted water), and we left plants of each species like witnesses. This will cause a secretion of tannins. We studied the genetic and biochemical answer of these plants. We made a bioinformatic study in order to identify the sequence (AAA (C) X_n (A/C/G) CGCG (C/G/T) n ≤ 18) (Taleb-Fromm consensus) in the promoter area of genes responsible of tannins biosynthesis, then we made a microbiological study to confirm what we found theoretically.

In the bioinformatic study we located the sequence sought in the promoter area of genes coding for the enzyme of the anthocyanidine synthase, as well as the anthocyanidine réductase. These enzymes play a major part in the biosynthesis of tannins.

The microbiological test showed that the extracts of the stressed plants have an important bactericidal effect compared to those that are in a normal state (not stressed). The stressed basil extracts showed an important inhibition zone with *S.aureus* compared to *E.coli*. For parsley and thyme we noticed the opposite i.e. the zone of inhibition were much more important with *E.coli* than with *S.aureus*. It means that as predicted from the bioinformatic study, the antibacterial power increases when the plants undergo stimuli.

It was concluded that at the time of a stress, there will be a genetic answer by enzymatic reactions which results in the biosynthesis of tannins and other elements known by their therapeutic properties.

Key words: bioinformatic, stress, tannins, chemical proportioning.

الملخص

قمنا بعرض ثلاثة أنواع مختلفة من نبات (ريحان, زعتر, و بقدونس) إلى أربعة أنواع من الإجهاد (البرد, ظلام, ماء ملاحه, ماء ملوت), وواحد من كل نوع مثل شاهد. هذا سيسبب إفراز الحامض عفصين. واحد درس الوراثة و جواب كيميائي حيوي من هذا معامل. جدًا من منفذون جعل في المنطقة (consensus Taleb-Fromm) $(AAA(C) X_n (A/C/G) CGCG (C/G/T) n \leq 18)$ واحد دراسة بيوفورميتيك أن يعين سبب [بروموتريس] المورثون مسؤول إلى مركب حيوي لحامض عفصين, بعد ذلك واحد جعل دراسة أحيائي دقيق أن يؤكدنا به نظريًا.

في الدراسة بيوفورميتيك حدّد أحد السبب يبحث في المنطقة [بروموتريس] المورثون يرمز للأنزيم من ال [أنثوسنيدين] [سنشس], و كذلك ال [أنثوسنيدين] [ردوكس]. يلعب هذا أنزيمات جزء في المركب حيوي الحامض عفصين.

أبدى الإختبار أحيائي دقيق أن المقتطفات من النباتات يضغط معامل يتلقون تأثير مهم مبيد للجراثيم يقارن إلى أن أي يكون في دولة عادي (لا يضغط). ال يضغط ريحان يتلقى مقتطفات منطقة من تصيد مهم مع [س.وريوس] يقارن إلى [إ.كلي]. لحزمة بقدونس وزعتر لاحظ واحد الضد [إي]. المناطق التصيد كان مهم مع [إ.كلي] يقارن إلى [س.وريوس], أي يريد أن يقول أن القوة مضادّ يزيد عندما المعامل يتحملون منبهات.

هو كان استنتجت أن [أت ث تيم وف] إجهاد, سيكون هناك جواب وراثي برد فعل أنزيمي أي ينتج في المركب حيوي من حامض عفصين وآخر عناصر يعرف بخاصيتهم ثريوتيك.

كلمة مفتاحية: [بيوفورميتيك], إجهاد, حامض عفصين, كيميائي يناسب.

Remerciements

C'est avec beaucoup de gratitude que je remercie le Professeur A.ADDOU directeur du laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement et de la Valorisation (STEVA) de la faculté de Sciences de l'Université de Mostaganem, qui m'a permis d'effectuer ce présent travail dans son laboratoire. Ainsi que Madame F.ABDELMALEK, Professeur à la faculté des Sciences de l'Université de Mostaganem, qui me fait l'honneur de présider mon jury.

En premier lieu, je tien à remercier Monsieur F.TALEB maitre de conférences à l'Université de Mostaganem, qu'il trouve l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir guidé tout au long de cette recherche.

Je remercie tous particulièrement. Monsieur M.R.GHEZZAR, Maitre de conférences à la faculté des Sciences de l'Université de Mostaganem, d'avoir accepté examiner ce travail.

Je veux adresser tous mes remerciements à Monsieur A.DJELLOUL, Maitre de conférences à la faculté des Sciences de l'Université de Mostaganem, qui m'ont fait l'honneur de faire partie du jury, et qui ont accepté de juger ce travail.

Un grand merci à tous mes collègues du laboratoire STEVA qui se reconnaîtront ici et particulièrement Mr S.ZIAT, Madame F.ABASSEEN, Madame F.BOUBDELLI, Madame A.TERKHI et Mr A.BENHLIMA.

DEDICACES

On tient à remercier le bon Dieu le tout puissant, qui avec son aide on pu accomplir ce mémoire.

Je dédie ce mémoire à :

Mes très chers parents que je remercie Dieu de les avoir protégées pour être témoins de ma réussite.

Mes frères et sœurs : Hamid, Sid'ahmed, Batoul et surtout Zineb qui ont été un soutien morale généreux et précieux pendant toutes mes années d'études.

Mes cousines : Hadjira, Radia, Nedjet, F.Zohra et Hakima.

Mes meilleurs amis : Kamélia, Nacéra, Samira, Amani, Amel, Aouda, Nabila, Zohra, Fatiha, Soumia, Aboubekr, Abdallah, Sid'ahmed, Djilali.

Partie Théorique

I.1. Introduction	1
I.2. Généralités	4
I.3. Définition du stress	4
I.3.1. Catégorie de stress	5
I.3.2. Stratégies de réponses au stress	5
I.4. Les composés phénoliques	8
I.4.1. Généralités	8
I.4.2. Les tanins	9
I.4.2.1. Généralités	9
I.4.2.2. Définition	9
I.4.2.3. Structure et classification	9
I.4.2.4. Propriétés physiques et chimiques des tannins	10
I.4.2.5. Propriétés pharmacologiques des tannins	10
I.4.2.6. Biogénèse des tanins	10
I.4.2.7. Intérêts	11
I.5. Le calcium	15
I.5.1. Généralités	15
I.5.2. Les sources de calcium	15
I.5.3. Canal Calcium	18
I.5.4. Pompes à Calcium	18
I.5.5. La signalisation calcique	18
I.5.6. Régulation du Calcium intracellulaire	20

I.5.7. Les cibles de la signalisation par le calcium	21
I.5.7.1. Protéines kinases dépendantes du calcium	21
I.5.7.2. La calmoduline	22
I.5.7.2.1. Structure	22
I.5.7.2.2. Le motif "EF - hand"	23
I.5.7.3. Mécanisme de changement de conformation de la calmoduline	23
I.6. L'ADN	24
I.6.1. Définition	24
I.6.2. Fonctions	25
I.6.3. Séquence de nucléotides	28
I.6.3.1. Bases azotées	28
I.6.4. Définition du gène	30
I.6.5. Le site de début de transcription (TSS : Transcription Starting Site)	31
I.6.6. Le promoteur	32
I.6.6.1. Le promoteur basal	32
I.6.6.2. Le promoteur proximal	33
I.7. Les enhancers et les silencers	33
I.8. L'insulator	35
I.9. Les facteurs de transcription	35
I.9.1. Régulation de l'expression génique par la calmoduline chez les plantes	38
I.9.2. CAMTAs: calmodulin-binding activateurs de la transcription à partir de plantes l'homme	38
I.9.3. Organisation de domaine de CAMTAs	39
I.9.4. Spécificité de l'ADN-relais aux CAMTAs	40
I.10. La bioinformatique	42
I.10.1. Introduction	42
I.10.2. Définition	42

I.10.3. Historique	43
I.10.4. Les applications de la bioinformatique	44
I.10.5. Principes de la bioinformatique	45
I.10.6. Les méthodes utilisées par la bioinformatique	45
I.10.7. Deux types de molécules support de la bioinformation : les acides nucléiques et les protéines	46
I.10.7.1. Les acides nucléiques	46
I.10.7.1.1. ARN : Acide RiboNucléique	46
I.10.7.1.2. ADN : Acide DésoxyriboNucléique	46
I.10.7.2. Protéine	47
I.10.8. Deux types de bioinformation : la séquence des nucléotides et la séquence des acides aminés	47
I.10.9. Les banques de séquence biologique	48
I.10.9.1. Historique	48
I.10.9.2. Le stockage de la bioinformation : les banques de données	50
I.11. L'antibiogramme	53
I.11.1. Le but de l'antibiogramme	53
I.11.2. Réalisation d'un antibiogramme	54
I.11.2.1. Principe général	54
I.11.2.2. Technique	54
Partie expérimentale	
Matériels et Méthodes	
II.1. Objectifs	55
II.2. L'utilisation du serveur NCBI	55

II.3. L'utilisation de logiciel d'alignement (NCBI BLAST)	56
II.4. L'utilisation du serveur EMBL	60
II.5. L'utilisation de logiciel d'alignement (EMBL BLAST)	61
II.6. Les plantes médicinales	68
II.6.1. Généralités	68
II.6.2. Les plantes médicinales choisie	68
II.6.2.1. Le basilic	68
II.6.2.2. Le thym	70
II.6.2.3. Le persil	72
II.6.3. Mode opératoire	76
II.6.4. Méthode d'extraction	80
II.6.4.1. Evaporation à sec	80
II.6.4.2. Détermination du taux d'humidité	80
II.7. Tests microbiologiques	81
II.7.1. Introduction	81
II.7.2. Les souches bactériennes testées	81
II.7.3. Matériel	85
II.7.4. Activation des bactéries	85
II.7.5. Préparation de la gélose	86
II.7.6. Réalisation des antibiogrammes	86
Résultats et Discussions	
III.1. Résultats de l'étude bioinformatique	87
III.1.1. Les séquences trouvées dans la banque génomique NCBI	87
III.1.2. Les séquences trouvées dans la banque génomique EMBL	95
III.1.3. Résultats d'alignement	98
III.2. Le taux d'humidité	100
III.3. Résultats du test du pouvoir antibactérien	103
III.3.1. L'effet de l'extrait de basilic sur E.coli et S.aureus	104
III.3.2 L'effet de l'extrait de persil sur E.coli et S.aureus	104
III.3.3. L'effet de l'extrait du thym sur E.coli et S.aureus	104
IV. Conclusion	
V. Références bibliographiques	

I.1. Introduction

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands parents, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres [1].

Il est acquis que les plantes médicinales sont en mesure de soigner des maladies simples comme le rhume, ou d'en prévenir de plus importantes comme l'ulcère, la migraine, l'infarctus en plus de certaines allergies ou affections. Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles sont susceptibles de nous apporter au quotidien [1].

Les plantes sont constamment soumises à des variations environnementales. Ces changements peuvent engendrer un stress qui modifie l'homéostasie cellulaire par la production de formes réactives de l'oxygène. L'accumulation phytotoxique de ces différents radicaux oxygénés peut entraîner la mort de la plante ; cependant, ils ont récemment été identifiés comme des acteurs essentiels de la réponse au stress et leur rôle comme messager secondaire est maintenant clairement établi [2].

Les stress environnementaux, comme la sécheresse, la salinité et les basses températures sont des conditions de stress qui affectent la croissance et le rendement des plantes. Contrairement aux animaux, qui peuvent se déplacer lorsque les conditions de vie ne leur sont plus favorables, les plantes ont développées des stratégies d'adaptation pour répondre aux changements environnementaux en contrôlant et en ajustant leurs systèmes métaboliques [2, 3].

Cependant, les conditions environnementales ne cessent jamais de manifester des changements et, ainsi, le système subit perpétuellement un stress [2, 3].

Dans ce concept, qui est basé sur la relation dynamique entre les plantes et leur environnement, aucun facteur environnemental n'est considéré a priori en tant que défavorable et la plante a "pour ne pas résister", mais elle réagit simplement. Dans la mesure où le système parvient à s'adapter, le stress est non seulement inoffensif mais, encore plus, constructif parce qu'il a comme conséquence la résistance améliorée; si l'adaptabilité du système est surchargée, alors le stress est destructif, menant aux dommages permanents ou même à la destruction [4].

Dans la nature, les êtres vivants sont parfois confrontés en permanence à une multitude de stimuli de l'environnement. De nature biotique ou abiotique ces stimuli peuvent provoquer à terme la mort de la plante qui contrairement aux animaux doit s'adapter sur place. Les conséquences vont du simple ralentissement de la croissance à la mort. Ces individus ont développées diverses stratégies pour faire face à ce type de stress [5].

Dans la chaîne d'évènements impliquée dans la mise en place d'une réponse adaptative, le calcium constitue l'un des seconds messagers majeurs qui va orienter cette réponse finale [5].

Cependant, en raison de son intervention dans des processus biologiques parfois antagonistes, une relation linéaire, allant de la perception du stimulus, à la mise en place de la réponse via une mobilisation du calcium, ne peut expliquer la spécificité de réponse [6].

Les mécanismes permettant de déclencher les réponses adaptées à la nature et à l'intensité du signal perçu reposent sur la capacité des plantes à percevoir les stimuli de l'environnement, à décoder ces signaux et à activer les programmes génétiques appropriés [6].

Cependant, les bases moléculaires qui sous-tendent les mécanismes de perception, de signalisation et de régulation de l'expression génique activés lors des contraintes environnementales restent encore mal connues [6].

Il est à présent bien établi que ces nombreux stimuli de l'environnement sont à l'origine de variations du taux de calcium dans la cellule végétale et que ces variations constituent un élément essentiel dans la mise en place des réponses aux contraintes de l'environnement [6].

Parmi les protéines capables de prendre en charge et de décoder ces signaux calciques, on trouve la calmoduline (CaM) qui est une protéine présente chez tous les eucaryotes capable d'interagir et de moduler l'activité de diverses protéines cibles [6].

La première partie (introduction) de ce travail a été consacrée à la définition et différentes catégories de stress environnementaux qui affectent la croissance et le rendement des plantes tel que la sécheresse, la salinité et les basses températures...etc. ainsi les différentes stratégies d'adaptation pour répondre aux changements environnementaux.

En outre, les composés polyphénoliques (plus particulièrement les tanins), les signaux calciques, l'Acide Désoxyribonucléique (ADN), les gènes, les promoteurs, les activateurs et les inhibiteurs de transcription et le rôle de la bioinformatique ont été largement traités et discutés.

Dans la deuxième partie (Matériels et Méthodes), on a démontré théoriquement par une étude bioinformatique (NCBI, EMBL) que le motif AAA (C) X_n (A/C/G) CGCG (C/G/T) (n<18) se trouve dans la région promotrice du gène responsable de la biosynthèse des tanins.

Pour confirmer ce qu'on a découvert théoriquement on a fait une étude expérimentale par un test microbiologique.

La partie 'Résultat et Discussion' contient tous les résultats obtenus avec leurs interprétations.

Le mémoire se termine par une conclusion.

I.2. Généralités

Il est admis que les plantes subissent, comme tous les êtres vivants, l'action de divers stress; chez les plantes cultivées, la baisse de rendement due à ces facteurs peut atteindre 50 %. Les stress communément rencontrés sont : l'action des températures extrêmes, positives et négatives, des régimes hydriques, des radiations et des concentrations salines [7]. Il suit que le sélectionneur doit tenir compte de ces données dans son travail de création de variétés. Si dans les régions tempérées l'action de ces facteurs est généralement modérée, les régions tropicales en revanche les subissent fortement [8].

I.3. Définition du stress

Le stress est défini comme l'action d'un facteur de l'environnement (ou la combinaison de plusieurs d'entre eux) limitant la réalisation des potentialités génétiquement déterminées de croissance, de développement et de reproduction chez les plantes [9].

La définition du stress chez les plantes apparaît avec des significations différentes en biologie, qui convergent principalement en attribuant le stress à n'importe quel facteur environnemental défavorable pour une plante. En conséquence, la capacité d'une plante à survivre à un facteur défavorable est appelée la résistance ou la tolérance au stress [10].

Lorsqu'une plante subit un stress, il y a une perte importante d'eau au niveau des cellules, provoquant une tension entre la membrane plasmique et la paroi végétale, un dysfonctionnement de la photosynthèse, et donc une baisse de rendement. Pour y remédier, la plante synthétise, entre autre :

- des osmoprotectants, comme la proline ou la glycine bêtaïne, qui permettent de maintenir l'équilibre en eau entre la cellule végétale et l'environnement extérieur,
- des protéines spécifiques,
- des acides gras afin de modifier la perméabilité de la membrane plasmique [11].

Les perturbations environnementales intervenant sur les plantes et leur milieu de croissance induisent des modifications métaboliques qu'il est possible de quantifier via l'activité photosynthétique. L'action des stress sur le métabolisme du végétal peut être décelée de manière précoce avant l'apparition des symptômes visuels afin d'enclencher rapidement les traitements correcteurs [12].

I.3.1. Catégorie de stress

On distingue 2 grandes catégories de stress :

- **Stress abiotiques :**
 - le stress hydrique ;
 - le stress thermique ;
 - la lumière quantitative (intensité) et qualitative (exposition aux UV, etc.) ;

- les carences minérales en éléments majeurs et en oligoéléments ;
- l'action d'éléments toxiques (aluminium, etc.).

En ce qui concerne les stress d'origine biotique, certains agents phytopathogènes peuvent induire des perturbations métaboliques qu'il est alors possible de détecter précocement [13].

1.3.2. Stratégies de réponses au stress

Il existe différentes stratégies de réponses au stress :

- **Stratégie d'échappement** : la totalité du cycle biologique est réalisée en dehors de la présence physique des stressseurs.
- **Stratégie d'adaptation** : réponses génétiques, acquises, héréditaires qui permettent à la population de s'ajuster à son environnement.
- **Stratégie d'acclimatation** : se rapporte à des modifications physiologiques non héréditaires, qui interviennent au cours de la vie d'un individu [14].

Les plantes ont développé des stratégies d'adaptation pour répondre aux changements environnementaux en contrôlant et en ajustant leurs systèmes métaboliques.

Les réponses cellulaires et moléculaires des plantes aux conditions de stress ont été très étudiées. Les mécanismes par lesquels elles perçoivent les signaux environnementaux et les transmettent à la machinerie cellulaire pour activer des mécanismes de réponses adaptées déterminent chaque jour leur survie [15].

La connaissance de ces réponses, basées sur la transmission (la transduction) de signaux de stress, est très importante afin d'améliorer la réponse des plantes cultivées aux différents stress environnementaux.

Ainsi, une voie de transduction d'un signal commence par la perception de ce signal au niveau de la membrane (par un senseur ou non), suivie par la production de seconds messagers et de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress incluant des changements morphologiques, biochimiques et physiologiques [16].

Mécanisme général de réponse des plantes à un stress est représenté dans la figure 1.

Les plantes sont réparties en trois catégories selon leur réponse au stress froid :

- les plantes sensibles au froid subissent des dommages quand les températures sont inférieures à 12 °C ;

- les plantes tolérantes au froid mais sensibles au gel peuvent s'acclimater à des températures inférieures à 12 °C mais ne survivent pas au gel ;
- enfin, les plantes tolérantes au froid et au gel survivent à des températures très inférieures à 0 °C. L'acclimatation au froid (au sens strict) permet de différencier les plantes sensibles au froid de celles qui sont tolérantes. L'endurcissement, quant à lui, différencie les plantes sensibles au gel des plantes tolérantes [17].

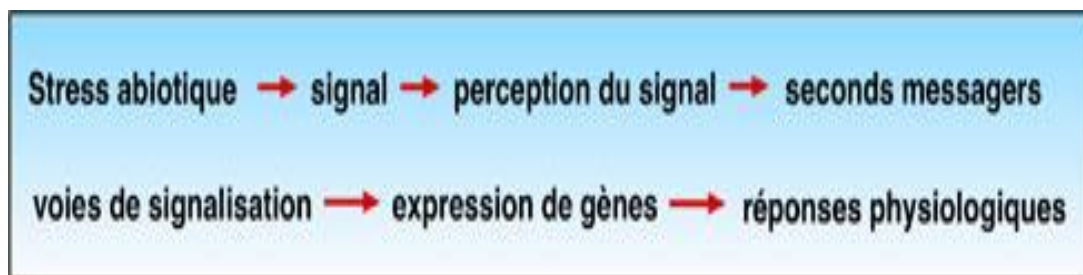


Figure1. Mécanisme général de réponse des plantes à un stress [16].

I.4. Les composés phénoliques

I.4.1. Généralités

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes.

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé [18]. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer [19], des maladies inflammatoires [20], cardiovasculaires [21] et neurodégénératives [22]. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [23].

Il existe différentes classes de polyphénols, notamment : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les stilbènes, les lignanes, les saponines, les phytostérols ou bien phytostanols. Les plus importants sont: les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins.

Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales. Comme exemple d'acide phénolique : les **acides benzoïques, les acides cinnamiques, les coumarines et l'acide gallique** [24].

Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées ré pondues chez les végétaux ; on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes.

Ils sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois. Leur fonction principale semble être la coloration des plantes (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois masquée par leur présence sous forme "leuco", ce qui explique leur intérêt commercial dans l'industrie alimentaire [25].

I.4.2. Les tanins

I.4.2.1. Généralités

Ils doivent leur nom à leur propriété de tanner la peau des animaux pour en faire du cuir. Pour cet usage, les tanins sont concurrencés par les sels métalliques. Cependant, ils sont toujours utilisés.

Leur propriété astringente explique l'utilisation très ancienne de certaines plantes en thérapeutique [26].

I.4.2.2. Définition

Ils sont d'origine végétale et non azoté. Ce sont des composés phénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. Ils sont souvent polymérisés donnant des molécules de poids moléculaire allant de 500 à 3000(PM). Ils ont une saveur astringente [26].

I.4.2.3. Structure et classification

On distingue 2 groupes de tanins :

Les tanins hydrolysables ;

Les tanins condensés.

➤ Tanin hydrolysable

Ce sont des esters d'acides phénols et d'oses : tanins pyrogalliques car ils fournissent du pyrogallol par distillation :

- **Gallo tanins** : esters de l'acide gallique et de l'acide digallique avec des oses généralement le glucose et même parfois l'hamamélose (dérivés du ribose)
- **Ellagi tannins** : de structure complexe

➤ Tanins condensés

Non hydrolysables ou tanin catéchique : *tanins condensés* ou *proanthocyanidines* (dégradés en milieu acide en antocyanidines colorées, réaction utilisée pour leur dosage colorimétrique) [26].

I.4.2.4. Propriétés physiques et chimiques des tannins

- Les tannins sont solubles dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, de saveur astringente ;
- Ils sont précipités de leur solution aqueuse par les sels des métaux lourds ;
- Avec les sels ferriques les tannins galliques et ellagiques donnent des précipités bleu noir, les tannins catéchiques donnent des précipités brun verdâtre ;
- Le formol, l'acide chlorhydrique, le brome ne précipitent que les tannins catéchiques [27].

I.4.2.5. Propriétés pharmacologiques des tannins

- Astringent à l'extérieur ;
- Anti diarrhéique à l'intérieur (ralentit le péristaltisme intestinal) ;
- Action antiseptique ;
- Vaso constricteur de petits vaisseaux (hémorroïdes, blessures superficielles) ;
- Anti inflammatoire dans les cas de brûlures ;
- Cholagogue notamment l'acide gallique et l'acide chlorogénique ;

-En industrie, les tannins jouent un rôle très important dans le tannage des cuirs [27].

I.4.2.6. Biogénèse des tanins

La biosynthèse de l'acide gallique et de ses dérivés se fait principalement par la voie de l'acide shikimique et secondairement par la voie de la β oxydation de l'acide trihydroxycinnamique [28]. (Figure3)

I.4.2.7. Intérêts

Les tanins sont utilisés fins thérapeutiques et industrielles à cause de leurs nombreuses propriétés.

A. Usage thérapeutiques

✓ Propriétés astringentes et cicatrisante

Appliqué sur la muqueuse et la peau, il se produit une sorte de tannage. Il s'y ajoute une action vasoconstrictrice sur les petits vaisseaux ; ce qui complète cette activité. Cette propriété explique leur emploi dans les hémorroïdes et les blessures superficielles.

✓ Propriétés anti-inflammatoire

Les tanins oligomères flavanoliqes auraient une activité antiélastase (extrait du pancréas du porc) ; ceci entraîne une diminution de la libération des peptides vaso-actifs et une diminution par conséquent de la libération des prostaglandines inductrices de l'élastase et des autre protéases. Ils diminuent le taux de cholestérol et préviendraient l'athéromatose.

✓ Propriétés antidiarrhéiques

Ils diminuent la perméabilité de la muqueuse intestinale.

✓ Propriétés antiseptique

Dans les infections pulmonaires ils agissent grâce à une action inhibitrice sur la croissance des bactéries, champignons et des virus [29] [27].

B. Usages industriels

Dans l'industrie de tannage, on utilise des extraits de plante plus ou moins purifiés.

Ils sont utilisés dans l'industrie du cuir, et se combinent sous forme de complexes aux protéines et rendent imputrescibles les peaux.

A cause de leur nature, les tanins sont des antifongiques et antibactériens.

Ils sont utilisés pour la protection des filets de pêche contre la prolifération des germes producteurs de cellules qui sont des enzymes responsables de la destruction de la cellulose des filets.

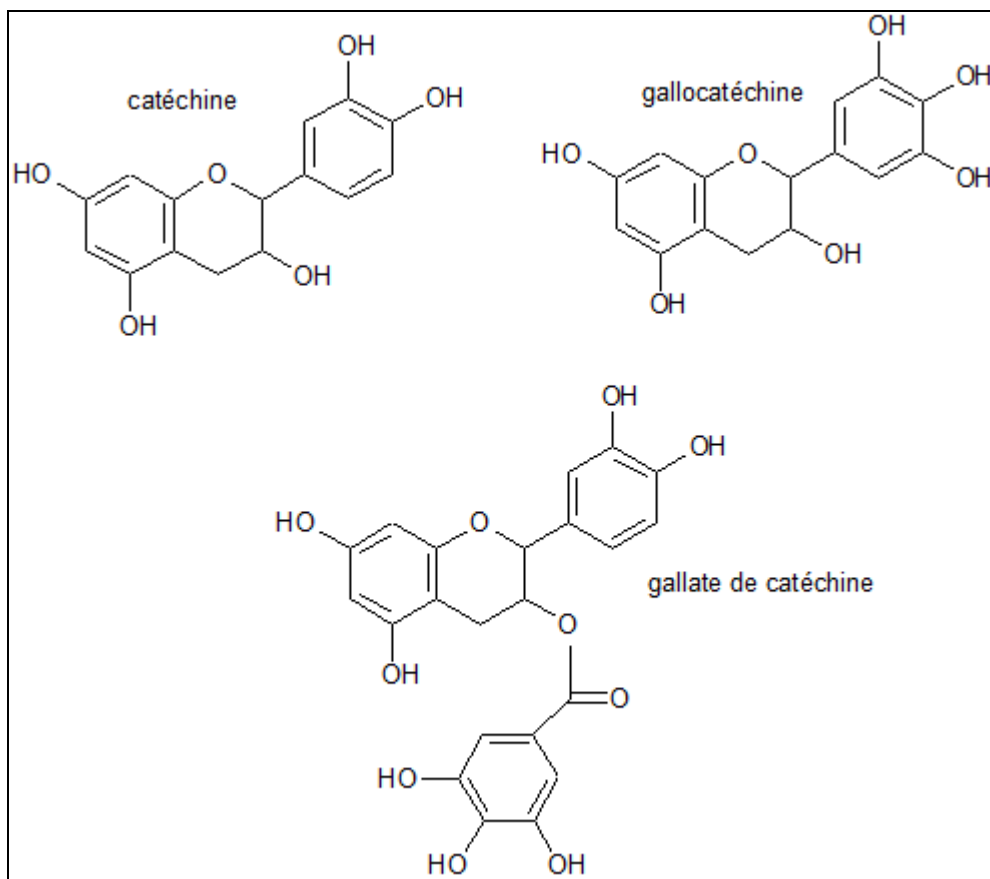


Figure2. Structure des tanins [26].

Tableau 1. Activités biologiques des composés polyphénoliques [31].

Polyphénols	Activités
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses
Flavonoides	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants

Ils sont employés pour la fabrication des adhésifs et des plastiques. Les tanins condensés se combinent avec le formole en donnant des polymères. C'est une application de la réaction de STIASNY utilisé comme procédé analytique pour différencier les tanins galliques des catéchiques. L'acide gallique et ses dérivés sont utilisés en industrie pharmaceutique pour la synthèse de certains médicaments et d'autres dérivés qui possèdent des effets thérapeutiques [30].

I.5. Le calcium

I.5.1. Généralités

Dans la chaîne d'évènements impliquée dans la mise en place d'une réponse adaptative, le calcium constitue l'un des seconds messagers majeurs qui va orienter cette réponse finale. Cependant, en raison de son intervention dans des processus biologiques parfois antagonistes, une relation linéaire, allant de la perception du stimulus, à la mise en place de la réponse via une mobilisation du calcium, ne peut expliquer la spécificité de réponse [32].

Le calcium est un élément chimique, de symbole Ca et de numéro atomique 20. Le calcium est métal alcalino-terreux gris et mou. Cet élément qu'on ne trouve jamais à l'état de corps pur dans la nature est le cinquième élément le plus abondant de la croûte terrestre et est essentiel pour la matrice organique [32].

L'ion calcium est un messager intracellulaire très important.

- il intervient dans de nombreuses voies de transduction du signal et joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme en contrôlant, directement ou indirectement. L'activité biologique de nombreuses protéines
- l'ion calcium se fixe à certaines protéines et cette fixation induit un changement de conformation de ces protéines [33].

I.5.2. Les sources de calcium

La figure4 présente les différentes voies permettant d'obtenir une augmentation de Calcium dans la cellule. D'une manière générale, l'augmentation de calcium est due :

- soit à une entrée (un influx) de calcium venant du milieu extérieur par l'intermédiaire de canaux calciques ;
- soit à une libération à partir des réserves internes au niveau du réticulum endo ou sarcoplasmique. Cette libération fait intervenir l'activation de récepteurs-canaux situés sur le réticulum.

Une augmentation prolongée du niveau de calcium est toxique pour la cellule (il précipite le phosphate, source d'énergie pour la cellule). La cellule maintient un faible niveau de calcium intracellulaire (effet tampon) grâce à l'existence de protéines capable de fixer le calcium [34].

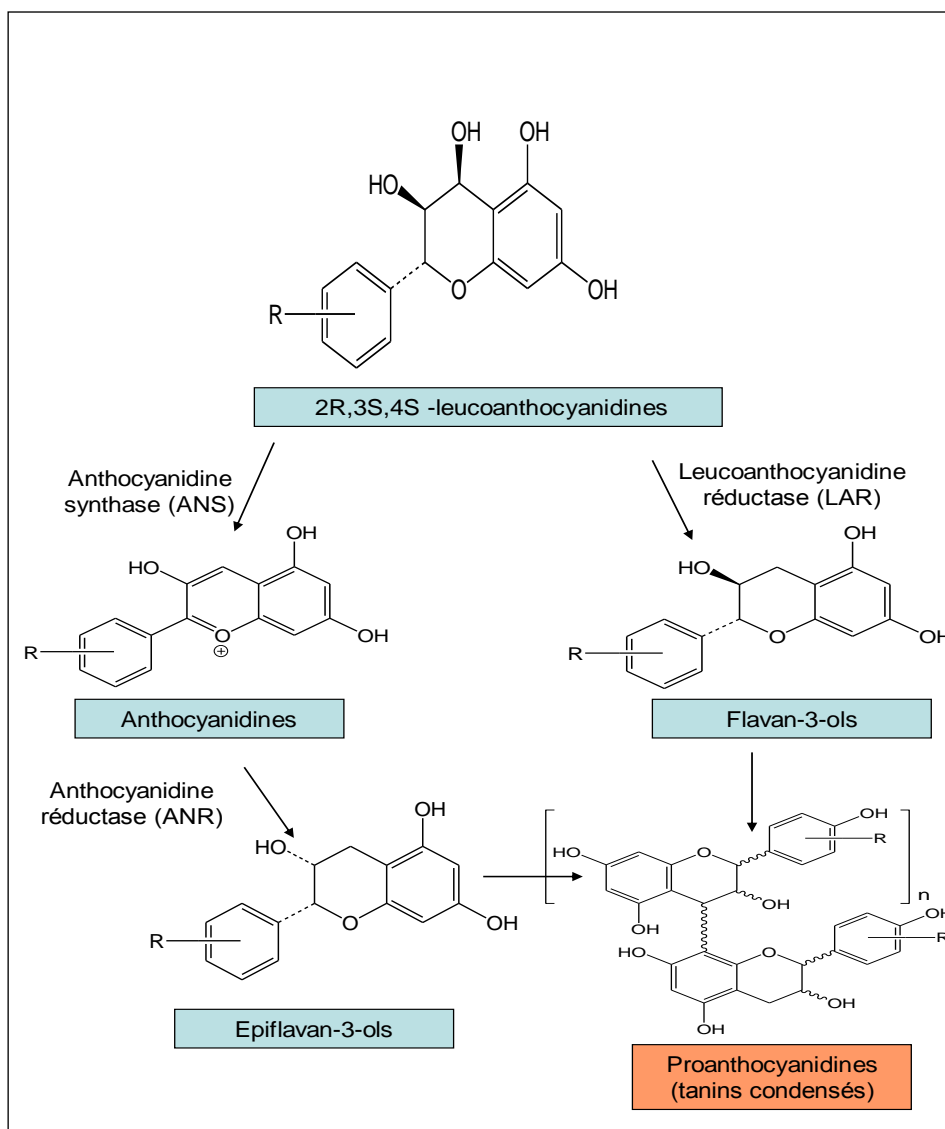


Figure3 : Formation des proanthocyanidines (tanins condensés) [28].

I.5.3. Canal Calcium

Le canal calcium ou canal calcique est une protéine transmembranaire responsable du passage facilité de l'ion Ca^{++} du milieu extracellulaire vers le cytoplasme.

La concentration du Calcium dans le milieu extracellulaire est de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Celle du cytoplasme est relativement très faible, environ $1 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$. De ce fait le Calcium tend à diffuser spontanément à travers le canal qui ne sert qu'à perméabiliser la membrane à l'ion Ca^{++} . C'est un mécanisme de diffusion facilitée.

Le canal présente un domaine extracellulaire, NH_2 -terminal, pour fixer les ions Ca^{++} ; sept domaines transmembranaires formant un canal pour conduire les ions à travers la barrière imperméable des phospholipides et un domaine intracellulaire COOH -terminal où se trouvent les sites de régulation commandant l'ouverture ou la fermeture du canal [35].

I.5.4. Pompes à Calcium

Lors de l'arrêt du signal Calcium, les canaux calciques se ferment dans les membranes des organites intracellulaires ou dans la membrane plasmique.

De puissants transporteurs actifs, hydrolysant de l'ATP pour fournir de l'énergie, permettent alors de vider le cytoplasme des ions Ca^{++} jusqu'à l'extinction du signal.

La concentration du Ca^{++} intracellulaire au repos est abaissée jusqu'à $0,15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, très inférieure à la concentration plasmatique : calcémie = $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, dont les 2/3 sous forme ionisée [35].

I.5.5. La signalisation calcique

Le calcium est un signal ubiquitaire contrôlant de nombreux processus cellulaires. C'est en 1883 que Sidney Ringer a montré le rôle prépondérant joué par le calcium lors de la contraction cardiaque chez la grenouille, mais ce n'est que depuis les vingt dernières années que le rôle du calcium dans la signalisation cellulaire commence à être compris. Le calcium intervient aussi bien chez les animaux que les végétaux pour transmettre des informations perçues au niveau de la membrane de la cellule vers des cibles intracellulaires.

Il intervient dans toutes les étapes de la vie : lors de la reprise de la méiose, à la fécondation et au cours de différents processus du développement embryonnaire et contrôle dans les cellules différenciées, de nombreuses fonctions physiologiques telles que la contraction musculaire, la sécrétion, la mémoire, l'apprentissage....

Comment un seul ion peut contrôler tous ces phénomènes. La signalisation cellulaire par le calcium est toujours liée à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} interne. Le signal calcique est caractérisé par son

amplitude, sa durée et aussi par sa fréquence et son origine. Le signal peut durer de quelques microsecondes à plusieurs heures, peut être transitoire ou peut présenter des variations de concentration oscillatoires.

La durée de vie du signal calcique est très courte comparée aux mécanismes mis en jeu pour obtenir l'expression des gènes [36].

Voies de signalisation dépendantes du Calcium

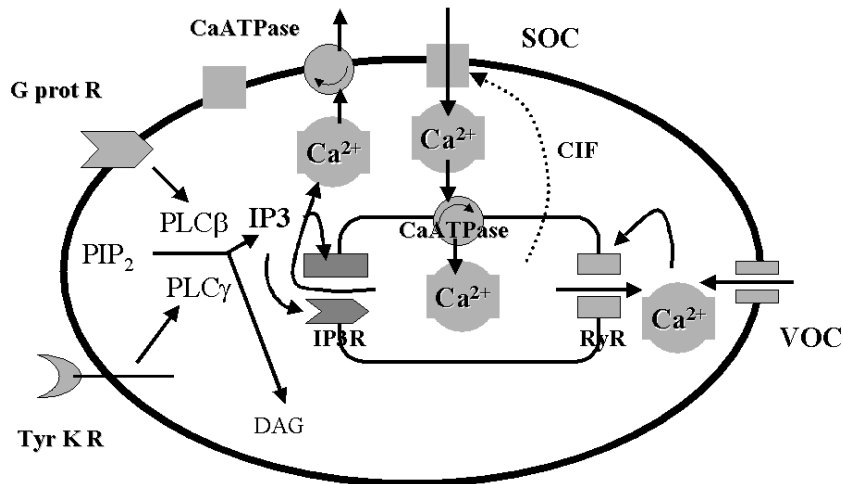


Figure4. Les différentes voies de signalisation dépendantes du calcium. VOC : voltage operated channel, RyR : récepteur à Ryanodine, IP3R, récepteur IP3 TyrKR : récepteur à tyrosine kinase, SOC : store operated channel [36].

I.5.6. Régulation du Calcium intracellulaire

Le signal Calcium est lié à la concentration cytoplasmique de l'ion Calcium. A l'extérieur de la cellule le Calcium est à une concentration relativement élevée : $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ dont un tiers environ est lié à des protéines (sérumalbumine). La concentration est aussi élevée dans les citernes du reticulum endoplasmique et les autres organites, où le Calcium est lié à diverses protéines : calséquestrine, calréticuline, endoplasmine.

Dans le cytoplasme au contraire la concentration de l'ion Ca^{++} est abaissée jusqu'à $0,15 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, mais elle peut s'élever rapidement ($10 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) ce qui constitue le signal Calcium.

La transduction du signal des hormones se fait par des récepteurs dont l'effet sur des phospholipases membranaires (effecteurs) aboutit à la production de l'inositol 1, 4, 5,-triphosphate (IP3), second messenger. L'IP3 à son tour est lié par un récepteur de la membrane du reticulum qui fait fonction de canal Ca^{++} à travers cette membrane, libérant les réserves de Calcium des citernes vers le cytoplasme. Il en est de même des canaux calciques de la membrane plasmique qui s'ouvrent pour laisser entrer le Calcium dans la cellule.

L'extinction du signal Calcium est très rapide par suite de l'activité permanente de pompes à Ca^{++} qui grâce à l'énergie de l'ATP enferment à nouveau les ions Ca^{++} dans le reticulum ou l'échangent avec des ions Na^+ pour le faire sortir de la cellule.

De nombreux facteurs modifient la concentration intracellulaire en calcium. Ce calcium est mobilisé soit par l'activation de canaux ou par une libération à partir de réserves internes.

Le gradient de concentration pour les ions Ca^{2+} est très élevé. La concentration intracellulaire est de l'ordre de 100 nM contre 1-2 mM à l'extérieur. Le gradient électrochimique (V-Eca) est en faveur d'une entrée de calcium dans la cellule. La sortie de calcium est un processus qui nécessite de l'énergie. De la même façon, la concentration en calcium à l'intérieur du réticulum est très élevée, de l'ordre de 100 μM . Ce qui veut dire que lors de la stimulation des récepteurs-canaux situés sur le réticulum le calcium va sortir selon le gradient de concentration. (Sens réserve vers cytoplasme). La reconstitution des réserves nécessite l'activation de calcium-ATPases [35].

I.5.7. Les cibles de la signalisation par le calcium

Les effecteurs des voies de transcription des signaux calciques peuvent être classés en deux catégories : d'une part, les capteurs primaires sensibles au calcium comme les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPK) et la calmoduline et d'autre part des canaux ioniques comme cela est le cas dans les cellules de garde où les canaux à anions sont activés lors de la fermeture des stomates, par la concentration cytosolique en calcium et aussi par phosphorylation. De même, les canaux contrôlés par dépolarisation sont aussi activés par le calcium, par le biais de la calmoduline [38].

I.5.7.1. Protéines kinases dépendantes du calcium

Chez les plantes et les protozoaires, les protéines kinases calcium dépendantes (" Calcium-dependent protein kinases" (CDPK)) médient le signal calcique.

Il semble que le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 34 gènes codant cette enzyme.

La structure des CDPK est différente de celle des CaM kinases. En effet, les CDPK possèdent (figure 5):

- un domaine catalytique (domaine kinase noté "K"). L'extrémité N-terminale (noté "N") est très variable.
- un domaine de "jonction" autoinhibiteur (noté "A"). L'inhibition a lieu en absence de calcium.
- un domaine de régulation C-terminal qui ressemble à la calmoduline (noté "CaM-like"). Ce domaine contient 4 motifs de fixation du calcium "EF-hands".

En conséquence, les CDPK sont activées directement par le calcium sans l'intervention de calmoduline exogène.

Le mécanisme d'activation des CDPK est très semblable à celui des CaM kinases.

Les CDPK ont une structure hautement conservée [38].

I.5.7.2. La calmoduline

La calmoduline est une protéine monomérique de 148 acides aminés, ubiquitaire, capable de s'associer aux ions calciums présents dans le milieu cellulaire. Cette liaison induit un changement de conformation de la protéine, et forme un complexe calmoduline/calcium. Ce complexe permet l'activation par changement de conformation de nombreuses protéines dont l'adénylate cyclase [37].

La plupart des calmodulines sont capables de fixer quatre ions Ca^{2+} , et leur fixation se fait par un effet coopératif. La calmoduline est donc une enzyme allostérique.

La calmoduline possède un rôle dans le métabolisme énergétique en se liant à la phosphorylase kinase afin d'activer la glycogénolyse. Ayant par ailleurs une structure similaire à celle de la troponine C (70% d'homologie) elle permet la synchronisation de la contraction musculaire et de la glycogénolyse [38].

I.5.7.2.1. Structure

On distingue 3 domaines dans la calmoduline :

- 1 domaine N-terminal
- 1 domaine central : une hélice de 7 tours
- 1 domaine C-terminal

Le domaine N-terminal et le domaine C-terminal possèdent deux (figure6) sites de fixation du calcium :

- ces sites ont une structure très particulière appelée "*EF-hand*", mise en évidence pour la première fois chez la parvalbumine (protéine du muscle qui fixe le calcium)
- c'est un motif hélice - boucle – hélice [38, 39].

I.5.7.2.2. Le motif "EF - hand"

Ce motif est composé de 30 acides aminés et contient 2 hélices α (E et F, figurées respectivement par l'index et le pouce d'une main, figure 7) reliées par une boucle. Lors de la fixation du calcium, l'hélice F passe d'une conformation "fermée" (apo-CaM en gris clair) à une conformation "ouverte" (holo-CaM en gris foncé) [39].

I.5.7.3. Mécanisme de changement de conformation de la calmoduline

a. Lors de la fixation coopérative du calcium :

apo-calmoduline (sans calcium) \leftrightarrow holo-calmoduline (4 atomes de calcium)

a. elle fixe 4 atomes de calcium de manière séquentielle : il y a un effet coopératif (figure 8) dans la fixation des 4 atomes de calcium.

Les 4 sites de fixation lient le calcium avec une très grande affinité mais avec des constantes de dissociation différentes : $K_D = 5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ à $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Les sites du domaine C-terminal ont une affinité plus grande que ceux du site N-terminal.

b. la fixation des atomes de calcium induit un changement de conformation de la calmoduline et notamment fait apparaître une longue hélice centrale.

c. elle adopte alors une conformation activante : c'est dans cette conformation qu'elle interagit avec ses protéines cibles pour en moduler l'activité [40].

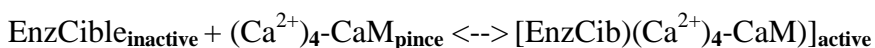
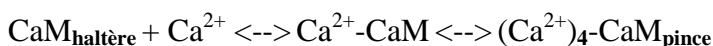
b. Lors de l'interaction avec les protéines cibles

On peut schématiser le changement de conformation qui s'opère sous forme d'une "haltère" qui se replie sur elle-même ("pince").

La CaM saturée en calcium s'enroule autour de régions spécifiques de la protéine cible.

Les équilibres de :

- fixation du calcium à la calmoduline
- fixation de la calmoduline à la protéine cible
- changements de conformations qui les accompagnent peuvent être écrits de la manière suivante :



- La calmoduline :

-Active la phosphodiesterase (EC 3.1.4.17) ;

- Contracte les fibres musculaires lisses ;
- Stimule les mouvements du fuseau achromatique ;
- Active la glycogénolyse ;
- Inhibe la glycogénogénèse [40].

I.6. L'ADN

I.6.1. Définition

L'**acide désoxyribonucléique** ou **ADN** est une molécule, retrouvée dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme. C'est aussi le support de l'hérédité car il est transmis lors de la reproduction, de manière intégrale ou non. Il porte donc l'information génétique, il constitue le génome des êtres vivants [41].

L'ADN détermine la synthèse des protéines, par l'intermédiaire de l'ARN.

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est contenu dans le noyau et une petite partie dans la matrice des mitochondries ainsi que dans les chloroplastes. Dans les cellules procaryotes, l'ADN est contenu dans le cytoplasme. Certains virus possèdent également de l'ADN dans leur capsid [41].

I.6.2. Fonctions

L'ADN est une macromolécule, polymère de nucléotides, dont la structure et les propriétés chimiques lui permettent de remplir toutes ces fonctions:

1. Sa fonction principale est de stocker l'information génétique, information qui conditionne le développement, le fonctionnement et le devenir d'une cellule et a fortiori celui d'un organe et d'un organisme. Cette information est contenue spatialement dans l'enchaînement non-aléatoire de nucléotides mais aussi temporellement dans l'activation ou la répression de ces séquences de nucléotides au cours du temps [42].
2. Une autre fonction essentielle de l'ADN est la transmission de cette information de génération en génération. Cela permet l'hérédité.
3. L'information portée par l'ADN peut se modifier au cours du temps. Cela aboutit à une diversité des individus et à une évolution possible des espèces. Cela est dû à des mutations dues principalement à des erreurs lors de la réplication des séquences de l'ADN (ajout, délétion ou substitution de nucléotides), ou bien à des recombinaisons génétiques[42].

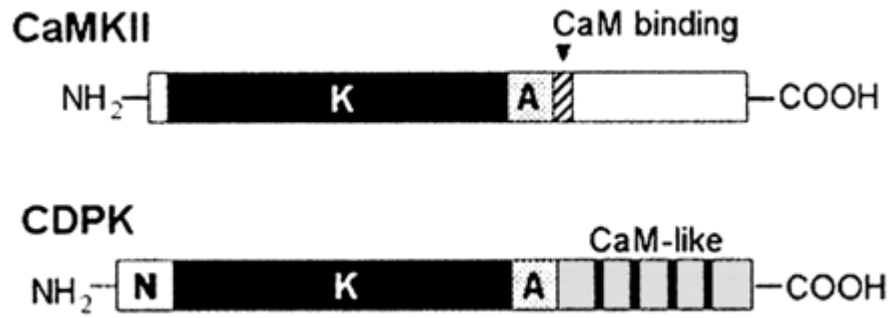


Figure 5. La structure de la protéine kinase calcium dépendante du calcium (CDPK) [38].

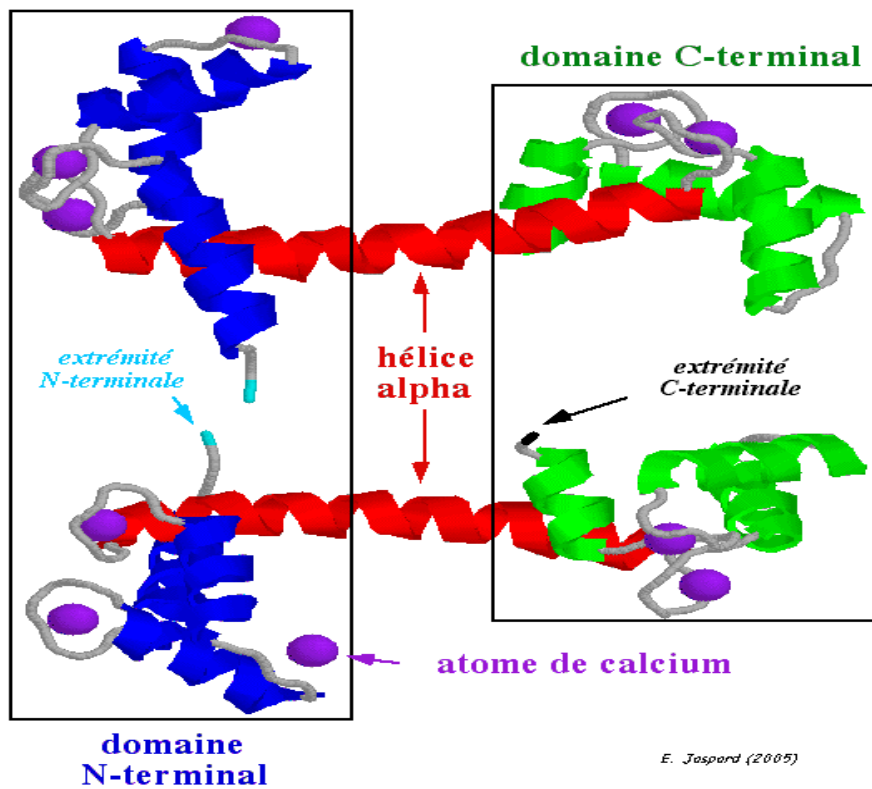


Figure 6. La structure de la calmoduline [44].

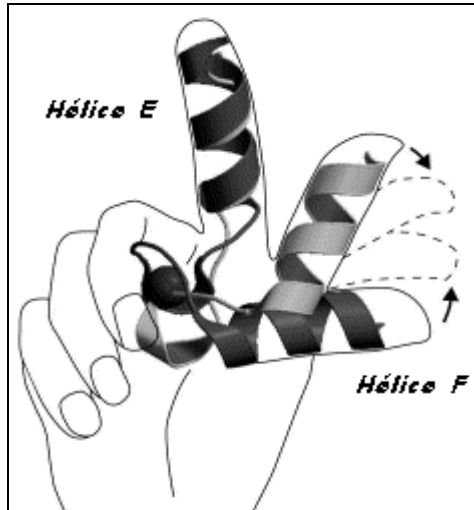
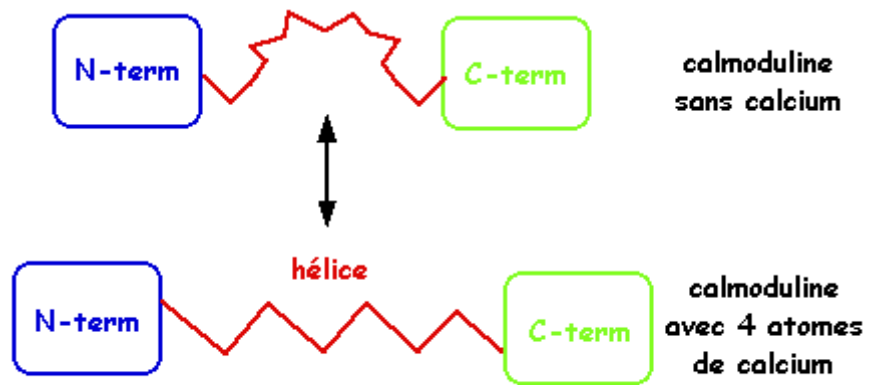


Figure 7. Le motif "EF - hand"[39].



E. Jaspard (2005)

Figure 8. Structure du complexe calmoduline/calcium [39].

L'ADN est donc le support de l'information génétique mais aussi le support de ses variations. En subissant les effets de la sélection naturelle, l'ADN permet l'évolution biologique des espèces [43].

I.6.3. Séquence de nucléotides

L'ADN est composé de séquences de nucléotides (figure9); on parle de polymère de nucléotides ou encore de polynucléotide. Chaque nucléotide est constitué de trois éléments liés entre eux:

- un groupe phosphate lié à:
- un sucre, le désoxyribose, lui-même lié à :
- une base azotée.

Il existe quatre bases azotées différentes: l'adénine (notée A), la thymine (notée T), la cytosine (notée C) et la guanine (notée G). Chaque base est fixée sur un désoxyribose pour former un nucléoside (figure10). Lorsqu'un nucléoside est lié à un ou plusieurs phosphates, on dit qu'il s'agit d'un nucléotide. Dans l'ADN, les nucléotides sont reliés entre eux selon une certaine séquence grâce à des liaisons impliquant un groupe phosphate, qu'on appelle des liaisons 3'-5' phosphodiester. Pour fabriquer un brin d'ADN, il suffit donc d'enchaîner des nucléotides en les reliant par ce type de liaisons, appelées liaisons fortes [43].

I.6.3.1. Bases azotées

Ce sont les quatre bases azotées qui assurent la variabilité de la molécule d'ADN, ainsi que la complémentarité des deux brins. En effet, il n'existe que deux types complémentaires de bases : une pyrimidique sera toujours en face d'une purique [32].

- La thymine (T) et la cytosine (C) sont de la famille des pyrimidiques.
- L'adénine (A) et la guanine (G) sont de la famille des puriques.

Un nucléotide est formé par un groupe de phosphate, du désoxyribose et une base azotée. Par conséquent, il existe quatre nucléotides différents. Un « brin » d'ADN est formé par la répétition ordonnée de ces nucléotides. Les bases azotées sont complémentaires deux à deux, une purique s'associant toujours à une pyrimidique: l'adénine s'associant avec la thymine et la guanine avec la cytosine. Les bases azotées complémentaires sont reliées entre-elles par des liaisons hydrogène [43].

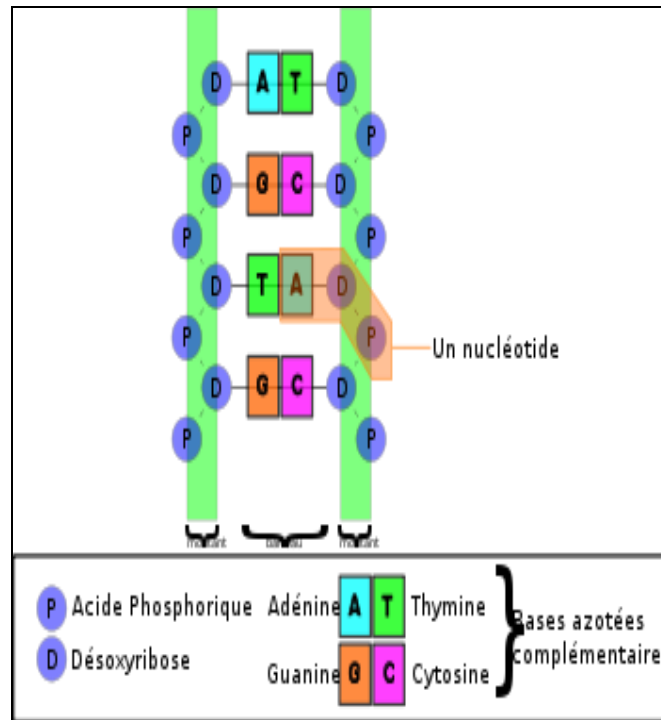


Figure 9. Structure de l'ADN [42].

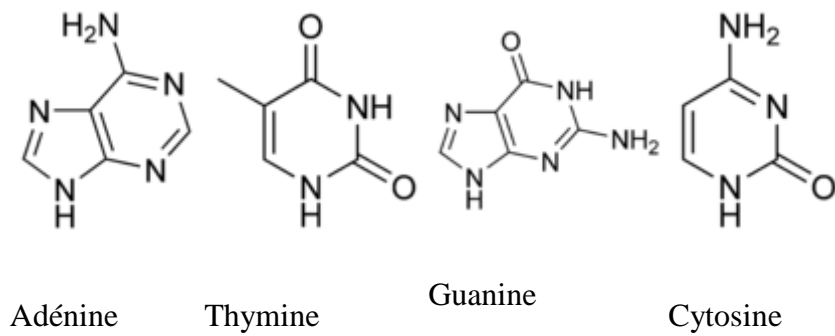


Figure 10. Structure des bases azotées [42].

I.6.4. Définition du gène

Aujourd'hui, un gène est défini comme un enchaînement de désoxyribonucléotides (dit aussi séquence), c'est-à-dire comme une portion d'acide désoxyribonucléique (séquence d'ADN), destiné à être transcrit en acide ribonucléique (ARN), donc on dit qu'un gène code pour une protéine [45, 46].

Généralement, un gène commence par une séquence de nucléotides appelée promoteur, dont le rôle est de permettre l'initiation mais surtout la régulation (tous les gènes ne sont pas exprimés dans toutes les cellules) de la transcription de l'ADN en ARN, et se termine par une séquence terminatrice, qui marque la fin de la transcription [47].

La molécule d'ARN ainsi produite peut soit être traduite en protéine (elle est dans ce cas appelée ARN messenger), soit être directement fonctionnelle (c'est le cas pour les ARN ribosomiaux ou les ARN de transfert) [47].

Chaque gène est transcrit dans le noyau en ARN primaire, qui est ensuite mûri en ARN messenger par un mécanisme d'épissage ; l'ARN messenger est alors exporté vers le cytoplasme où il est traduit en protéine au niveau des ribosomes [48].

Les gènes sont constitués d'éléments ayant des fonctions diverses :

- Les exons, qui contiennent les séquences codantes du gène, et qui seront traduites en protéine ;
- Les introns, qui sont intercalés entre les exons, et seront éliminés avant l'étape de traduction en protéine (figure10 et 11) [49].

Au niveau des ribosomes, qui sont des sortes d'usines à synthétiser les protéines, les nucléotides se faisant suite dans l'ARN messenger sont lus trois par trois, chaque groupe de trois nucléotides s'appelant un codon. Chaque codon indique précisément quel acide aminé doit être incorporé dans la protéine en cours de fabrication. Trois codons sont particuliers : ils ne codent pas pour un acide aminé, mais au contraire indiquent que la synthèse de la protéine doit s'arrêter car on est au bout de l'ARN messenger. Ces trois codons sont appelés codons STOP [49].

La transcription des différents types d'ARN utilise trois ARN polymérases différentes

- **pol I.** pour les ARNr ;
- **pol II.** pour les ARNm ;
- **pol III.** Pour les ARNt et l'ARNr.

La plupart des gènes contiennent deux types de promoteurs et un certain nombre de domaines de régulation de la transcription [50].

La régulation de la transcription dépend donc de plusieurs éléments (Figure 12):

- Le site de début de transcription (TSS : Transcription Starting Site) ;
- Un promoteur ;
 - Le "basal promoter" ou "core promoter"
 - Un "upstream promoter" ou promoteur proximal
- Des "enhancers" ;
- Des "silencers" ;
- Un "insulator"[50].

I.6.5. Le site de début de transcription (TSS : Transcription Starting Site)

Le TSS est l'endroit où l'ARN polymérase se fixe. Pol II est un complexe de 12-14 protéines différentes (en jaune sur la Figure 13).

L'ARN polymérase doit reconnaître le début de la séquence codante pour l'ARN. Cette reconnaissance se fait par l'intermédiaire d'une de ses sous-unités qui se lie à un domaine particulier de l'ADN présent dans le gène. Pour certains, cette séquence fait partie du promoteur. Elle indique à la polymérase où se lier mais également dans quel sens démarrer et sur quel brin (Figure 14).

L'ARN polymérase ouvre la double hélice, et commence à synthétiser un ARN complémentaire du brin anti sens, donc de séquence identique à celle du brin "sens" ou "codant"[51].

I.6.6. Le promoteur

Une séquence promotrice est une région située à proximité d'un gène et indispensable à la transcription, sur laquelle se fixe l'ARN polymérase. Les séquences promotrices sont situées en amont du site d'initiation de la transcription [50].

La fixation et l'activation de l'ARN polymérase sont contrôlées par des facteurs de transcription (éléments trans-régulateurs) qui se fixent au niveau de séquences cis-régulatrices spécifiques classiquement appelées éléments de réponse, situées à des distances variables du site de démarrage de la transcription [51].

Les facteurs de transcription peuvent être soit des activateurs, soit des répresseurs de la transcription. Par ailleurs, l'ADN n'est pas libre dans le noyau mais enroulé en une structure particulière appelée nucléosomes et associée à des protéines non-histones. L'état de condensation de cette structure chromatinienne au niveau des promoteurs des gènes conditionne leur transcription [51, 52].

Le promoteur proprement dit est constitué de deux éléments :

1. Le "basal promoter" ou "core promoter" ;
2. Un "upstream promoter" ou promoteur proximal.

I.6.6.1. Le promoteur basal

Contient une séquence de 7 nucléotides du type TATAAAA, dénommé la TATA-box. A cet endroit se lie un complexe de quelques 50 protéines, parmi lesquelles :

- Le facteur de transcription IID (TFIID), qui est lui même un complexe.
 - La TATA-binding protein (TBP) qui reconnaît et se fixe sur la TATA-box ;
 - 14 autres protéines qui se lient au TBP et entre elles, mais pas à l'ADN.
- Le Facteur de transcription IIB (TFIIB) qui se lie à la fois à l'ADN et à pol II.

Ce promoteur basal se trouve dans tous les gènes codant pour des protéines et est de composition bien conservée. La TATA-box est localisée 20-30 nucléotides en 5' du site de début de transcription (TSS pour Transcription Starting Site) et sa composition est en fait du type consensus : $TATA^T/_A A^T/_A$.

En plus de la TATA-box, de nombreux gènes contiennent une seconde séquence de signalisation (initiator ou sequenc Inr) qui recouvre le TSS. Certains gènes n'ont que cette séquence et pas de TATA-box [53].

I.6.6.2. Le promoteur proximal

Des séquences régulatrices cis-acting se trouvent fréquemment en amont de la TATA box. En particulier deux types de séquences dans la région du promoteur proximal, situées généralement dans les 100-200 bases en amont de la TATA box et ayant des compositions voisines de CCAAT et GGGCGG. Ces régions lient des protéines spécifiques.

- La **CCAAT**-box (se prononce *cat*).

La CCAAT-box est du type consensus $GG^T/_C CAATCT$ et se trouve plus en 5' de l'ordre de 50 à 130 en amont du TSS. La protéine **C/EBP** (pour **CCAAT**-box/**Enhancer Binding Protein**) se lie à la CCAAT-box.

De nombreux gènes partagent les mêmes sites de liaisons aux facteurs de transcription, non seulement en ce qui concerne le promoteur basal, mais également plus en amont. Mais c'est la combinaison de tous qui permet d'avoir une spécificité d'expression. Leur nombre, qualité et position varient de gène à gène, c'est leur combinaison qui régule l'expression de façon fine (dans les tissus et dans le temps). De cette façon un même gène peut être exprimé de manière très différente dans des types cellulaires distincts ou en réponse à des signaux spécifiques [53].

I.7. Les enhancers et les silencers

Chez les eucaryotes on distingue deux classes d'éléments cis-actings. Ils peuvent exercer une influence sur des distances considérables (jusqu'à 50 000 bases, voire plus) du TSS.

Les enhancers augmentent considérablement l'activité de la transcription. Les silencers au contraire inhibent plus ou moins la transcription.

Ces éléments peuvent être localisés en amont, en aval ou même dans le gène. Ils sont généralement composés de copies multiples de séquences sur lesquelles se lient les protéines de régulation (5 à 10% du génome humain) [53].

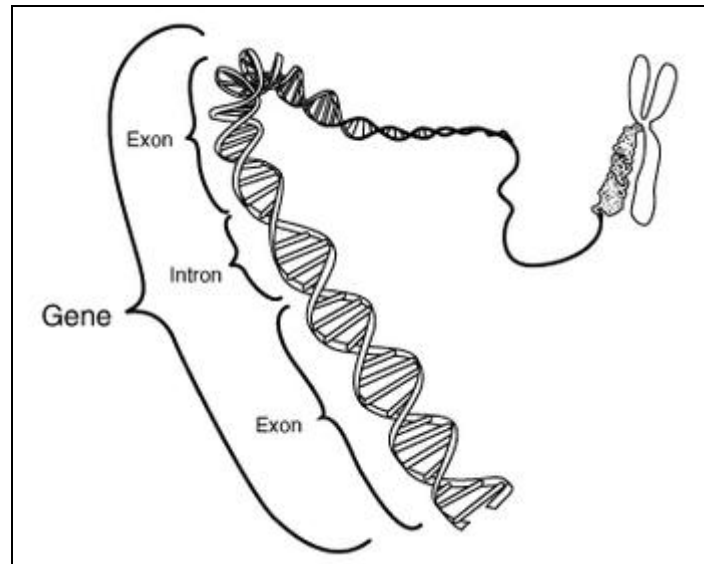


Figure11. Présentation simplifiée d'un gène d'eucaryote [49].

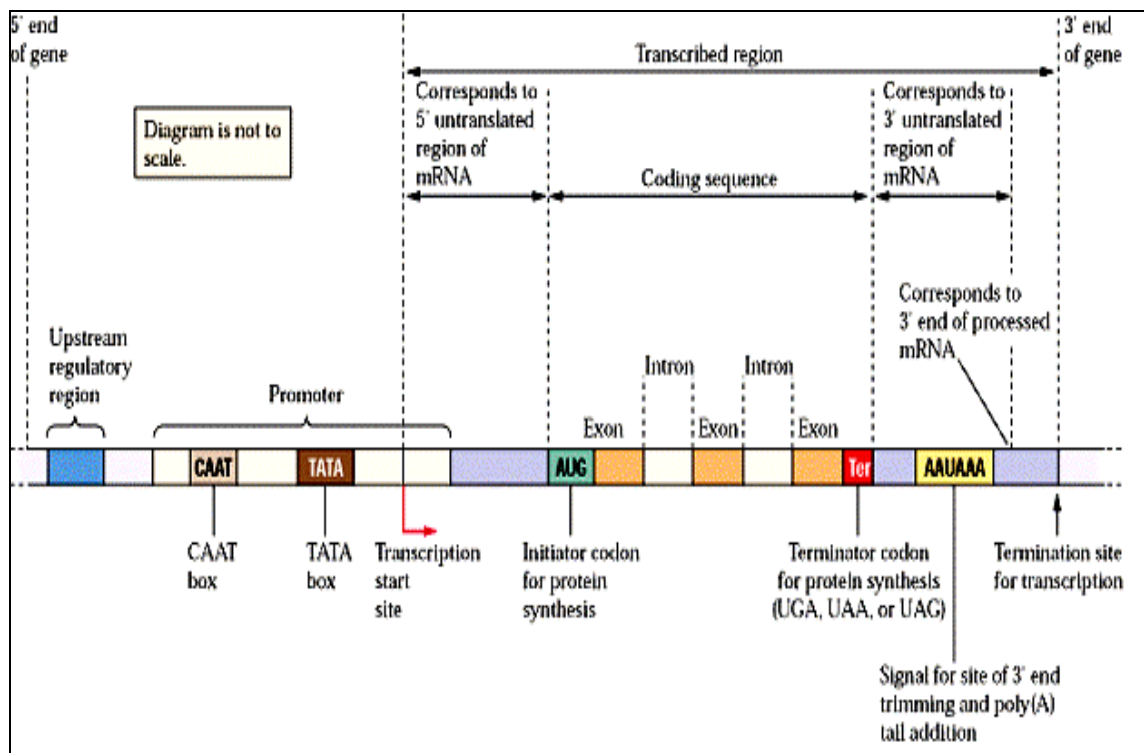


Figure12. Représentation générale d'un gène [55].

I.8. L'insulator

Ces régions régulatrices ayant un effet des milliers de bases à distance, il faut trouver un moyen pour que cette action ne soit pas répercutée sur le gène suivant. Cette fonction est assurée par un "insulator" qui se compose ainsi :

- Un court fragment d'ADN (42 bases peuvent suffire).
- Localisé entre
 - les enhancers et le promoteur ou
 - le(s) silencer(s) et le promoteur [53]

I.9. Les facteurs de transcription

Si la transcription est bien effectuée par l'ARN polymérase, cette enzyme pour fonctionner requiert la présence d'autres protéines. Celles-ci sont soit directement associées à l'ARN polymérase, ou sont nécessaires au fonctionnement de la machinerie. On appelle facteur de transcription (transcription factor), l'ensemble de ces protéines à l'exception de l'ARN polymérase elle-même [54].

Leurs interactions peuvent être de la forme :

- Liaison à l'ARN polymérase ;
- Liaison à autre un facteur de transcription ;
- Liaison à des séquences d'ADN cis-acting ;
- Le «basale transcription apparatus" : L'ARN polymérase + l'ensemble des facteurs de transcription.

Les facteurs de transcription qui coopèrent avec l'ARN polymérase peuvent être divisés en trois groupes :

- Les **facteurs généraux** de transcription, qui sont nécessaires à l'initiation de la synthèse de l'ARN au niveau des gènes de classe II (gènes codants pour des protéines). Ils forment avec l'ARN pol II un complexe au niveau du site d'initiation de la transcription et déterminent ainsi le site de démarrage de la transcription ; ce complexe est appelé **complexe basal de transcription**.
- Les facteurs de transcription généraux et spécifiques de séquence, qui reconnaissent des petites séquences d'ADN localisées en amont du site de démarrage de la transcription (comme le facteur SP-1 qui reconnaît les boîtes GC). Ces facteurs sont ubiquitaires, ils augmentent l'efficacité de la transcription des gènes contenant les boîtes GC dans leurs promoteurs.

- Les facteurs de transcription spécifiques de séquence et inductibles, qui possèdent un rôle régulateur. Ils sont synthétisés ou activés d'une manière spécifique de tissu. Les séquences qu'ils reconnaissent sont appelées les *éléments de réponse* [54].

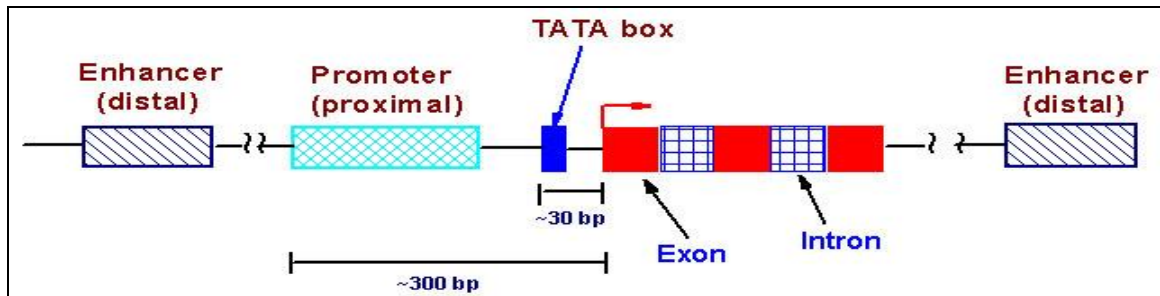


Figure 13. Structure typique d'un gène eucaryote à ARNm [50].



Figure 14. La région promoteur des eucaryotes "supérieurs". La TATA-box est environ 30 bases en amont du TSS. Généralement deux ou plus régions forment le promoteur proximal, souvent dans la zone 100-200 en amont du TSS. Dans cette figure sont indiquées la CCAAT-box et une région riche en GC [51].

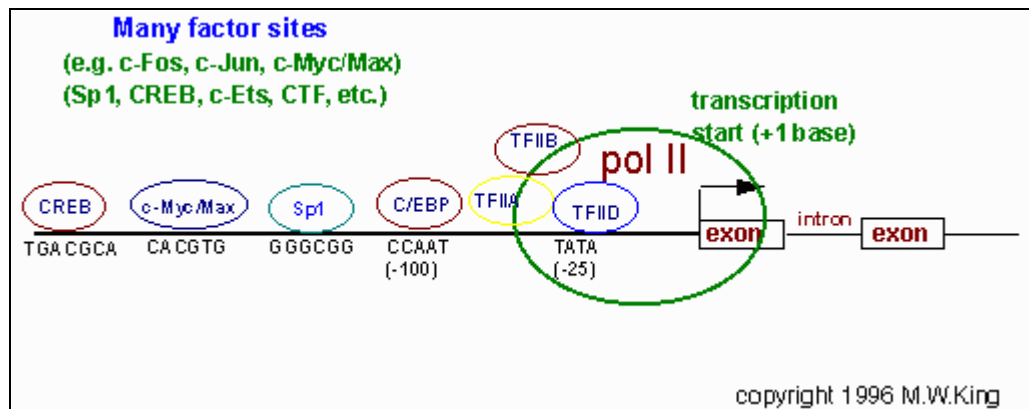


Figure 15. Structure typique de la région en 5' d'un gène à deux exons codant pour un ARNm. Les boîtes TATA-box and CCAAT-box sont indiquées aux positions respectives -25 et -100. Le facteur de transcription TFIID est indiqué comme la protéine de liaison à la TAT-box (TATA-box binding protein, TBP). D'autres facteurs de transcription sont indiqués en 5' de ces boîtes, leur localisation et ordre n'est pas général (CREB=cAMP response element binding protein; C/EBP=CCAAT-box/enhancer binding protein). Le cercle vert représente la localisation de l'ARN polymérase II [51].

I.9.1. Régulation de l'expression génique par la calmoduline chez les plantes

Comme tous les organismes, les plantes intègrent en permanence les fluctuations de l'environnement, et modulent en conséquence leur croissance et leur développement. Parmi les systèmes de signalisation servant de relais entre la perception des stimuli et les réponses biologiques, le calcium participe, en tant que second messenger, à la régulation de nombreux processus cellulaires, et au routage d'informations jusqu'au compartiment nucléaire où sont activés les programmes génétiques appropriés [56].

La calmoduline (CaM) est une protéine capable de percevoir les variations du taux de calcium par des motifs de type EF-hand, qui ont une affinité élevée pour cet ion [57]. Le complexe Ca^{2+} /CaM interagit et module l'activité de protéines cibles, qui présentent des structures et des fonctions variées. À côté d'une forme typique de CaM conservée chez tous les eucaryotes, les plantes possèdent un répertoire particulier de protéines apparentées à la CaM, dont les fonctions commencent à être décrites [58].

Différents travaux sur les CaM végétales et leurs cibles montrent l'importance de la signalisation calcique dans les processus associés à l'expression génique. En particulier, l'étude d'une forme atypique de CaM, présente dans le tabac, a révélé son intervention dans le contrôle du gene silencing [59].

Ce mécanisme de régulation de l'expression génique, initialement identifié chez les plantes, est un processus général chez les eucaryotes, qui agit par la dégradation ciblée d'ARN messagers. Des approches génétiques conduisant à moduler le niveau d'expression de cette CaM de tabac ont démontré son rôle essentiel dans la suppression du phénomène de gene silencing.

D'autres travaux relatifs à la distribution sub-cellulaire des pools de CaM, indiquent une dynamique de répartition de la CaM entre le cytosol et le noyau. Par exemple, la CaM 53 du pétunia et la CaM 61 du riz, deux isoformes qui se distinguent de la CaM typique par la présence d'un motif de prénylation à leur extrémité carboxy-terminale, se trouvent ancrées au plasmalemme lorsque les plantes sont exposées à la lumière [60].

En revanche, un passage à l'obscurité provoque leur accumulation dans le noyau, ce qui indique une mobilisation nucléaire de ces CaM lors d'un changement de régime lumineux [61].

I.9.2. CAMTAs: calmodulin-binding activateurs de la transcription à partir de plantes l'homme

Récemment, une nouvelle famille de la calmoduline-binding activateurs de transcription (CAMTAs) a été signalée chez les eucaryotes différents. Tous partagent CAMTAs une organisation de domaine similaire, avec un nouveau type de séquences d'ADN spécifiques domaine de liaison (désignés CG-1). Ce domaine pourrait lier l'ADN directement et activer la transcription, ou d'interagir avec les autres facteurs de transcription, et non par liaison à l'ADN, agissant ainsi comme un co-activateur de la transcription [62].

Calmodulin-activateur de la transcription de liaison (CAMTA) 3 (aussi appelé SR1) est un facteur de transcription de la calmoduline obligatoire dans *Arabidopsis thaliana* qui contient six gènes CAMTA (AtCAMTA1-AtCAMTA6).

Fractionnement subcellulaire de tissus d'*Arabidopsis* a révélé la présence de CAMTAs principalement dans le noyau. Des essais de fixation Calmoduline identifié une région de 25 acides aminés capables de liaison de la calmoduline avec une haute affinité en présence de calcium.

CAMTAs représentent une famille conservée de facteurs de transcription dans un large éventail d'eucaryotes multicellulaires, qui répondent peut-être à la signalisation calcique par liaison directe de la calmoduline [63].

I.9.3. Organisation de domaine de CAMTAs

Les protéines de CAMTA se composent du multiple ont prévu des domaines fonctionnels, conservés dans les séquences des acides aminés, et organisés dans un ordre conservé (figure.16). Les domaines fonctionnels incluent : signaux nucléaires de localisation (NLS) ; CG-1, un domaine unique d'ADN-binding; TIG, un domaine impliqué dans les contacts non spécifiques d'ADN dans TFs [64], et impliqué dans la dimérisation de protéine [65, 66] ; Les répétitions d'ANK (ankyrin), qui sont présentes en tant que modules tandemly répétés d'environ 33 acides aminés dans un grand nombre de protéines et de virus d'eucaryote, et participent aux interactions de protéine-protéine [67, 68, 69]. En outre, CAMTAs contiennent un nombre variable des motifs de Q.I. [70]. Les motifs de Q.I sont connus pour être associés à lier de la CAM et CAM-like les protéines [71].

I.9.4. Spécificité de l'ADN-relais aux CAMTAs

Le contrôle de la transcription est le résultat d'un réseau compliqué entre les différents canaux, les isoformes de CAM, les CBPs (CGCG-box Binding Protein) et d'autres régulateurs. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs facteurs de transcription liée aux sites de séquence spécifique de l'ADN ont été identifiés [72].

Les facteurs spécifiques à l'ADN-relais (SSDB) jouent un rôle crucial dans la transcription, la réplication, la recombinaison et dans la réparation de l'ADN.

Yang et Poovaiah (2002) [73] ont utilisé un groupe de 30 séquences aléatoires d'oligonucléotides afin de vérifier si la protéine nucléaire (ou CAMTA3, At2g22300) avaient une interaction spécifique avec l'ADN [73].

Les retardateurs d'oligonucléotide ont montré qu'il y a 6-pb commune ACGCGG (ou CCGCGT) dans 50% des cas. Chacun d'entre eux partagent la séquence CGCG au milieu de (A/C/G) CGCG (C/G/T) consensus box CGCG. Taleb et al. Ont trouvé un consensus plus large AAA(C)(X_n)(C/A/G)CGCG(C/G/T) avec n<18 [62]. C'est le consensus Taleb/Fromm [72].

Yang et Poovaiah (2002) ont signalé la présence d'un box CGCG dans les promoteurs d'un grand nombre de gènes de divers organismes multicellulaires, et ils ont montré que les motifs étaient présents dans les régions promoteur d'environ 130 gènes dans le génome d'*Arabidopsis* [73].

Le motif CGCG pourrait générer une structure secondaire, qui joue un rôle dans la décélération ou l'identification de différents facteurs de transcription [74].

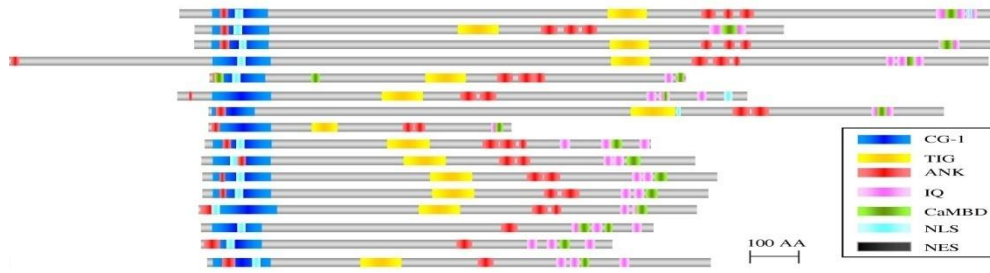


Figure 16. Structure de la protéine CAMTA [64].

I.10. La bioinformatique

I.10.1. Introduction

D'importants changements dans le domaine de la biologie se sont produits au cours des dernières décennies. Les progrès de la biotechnologie et des réalisations telles que la cartographie complète du génome humain et du génome de nombreux autres organismes offrent une meilleure compréhension des systèmes biologiques et des organismes vivants. De vastes quantités d'information et de données biologiques ont été générées et continuent de l'être par ces recherches. La bioinformatique est née de la nécessité d'organiser, de sauvegarder et d'analyser cette information [75].

I.10.2. Définition

La bioinformatique est l'utilisation de logiciels et de programmes informatiques pour organiser, stocker et analyser l'information et les données biologiques afin d'améliorer notre compréhension des systèmes biologiques. C'est un domaine scientifique où la biologie, l'informatique et la technologie de l'information convergent en une discipline unique [75].

Les chercheurs utilisent des techniques informatiques et statistiques de pointe pour se retrouver dans la multitude de données biologiques engendrées par les biotechnologies modernes appelées « omiques », comme la génomique et la protéomique, et pour analyser ces données [75]. Ces technologies « omiques » portent sur différents aspects des systèmes biologiques. Par exemple :

- **La génomique** est l'analyse systématique de toute la composition génétique d'un organisme. Elle comprend l'étude de la fonction des gènes dans les cellules, les organes et les organismes.
- **La protéomique** se penche sur l'ensemble de la composition protéinique d'une cellule à tout moment donné [76].

Ces technologies « omiques » génèrent d'énormes quantités de données biologiques dans lesquelles il serait impossible de naviguer sans systèmes informatiques. Les données comprennent notamment les séquences des acides aminés et des nucléotides qui sont à la base des gènes et des protéines [76].

La bioinformatique vise à traduire les données complexes recueillies en information utilisable.

En général, la bioinformatique comprend trois domaines principaux :

- Le développement de nouvelles statistiques et données qui seront étudiées et utilisées pour évaluer les relations entre les différents ensembles de données biologiques.

- L'analyse et l'interprétation des divers types de données, y compris les séquences des nucléotides et des acides aminés et les propriétés des diverses protéines.
- Le développement et la mise en œuvre d'outils permettant un accès et une gestion efficaces de différents types de renseignements pertinents [76].

I.10.3. Historique

Le domaine de la bioinformatique a émergé au début des années 1980 avec la création de la base de données GenBank. Créée par l'US Department of Energy, GenBank met en mémoire l'information sur les séquences d'ADN provenant d'un large éventail d'organismes. Au début, GenBank était une petite entreprise dans laquelle quelques techniciens assis devant leur clavier saisissaient l'information relative aux séquences d'ADN publiées dans les revues spécialisées [77].

La création d'Internet a permis aux chercheurs de partout dans le monde d'accéder gratuitement aux données de GenBank. Les données de GenBank sur les séquences de l'ADN se sont multipliées avec l'apparition d'outils hautement techniques de séquençage des gènes. Des entreprises privées se sont jointes à la course au séquençage avec des projets parallèles et ont créé leurs propres énormes bases de données [77, 78].

Au fur et à mesure que le besoin d'accès à la bioinformatique augmentait, plusieurs services sont apparus. Les deux réseaux les plus importants ont été le Réseau européen de biologie moléculaire (EMBnet) et l'United States National Center for Biotechnology Information (NCBIO) [79].

Au Canada, l'Institut canadien de l'information scientifique et technique (ICIST) du Conseil national de recherche du Canada (CNRC) a exploité un serveur de bioinformatique, le Système de base de données de biologie moléculaire (SBDBM) de 1987 à 1996. Ressource de bioinformatique Canada (RBC) a été créé en 1995 pour remplacer le SBDBM dans le but de fournir des ressources et des services de bioinformatique aux chercheurs canadiens [79].

I.10.4. Les applications de la bioinformatique

La plupart des outils bioinformatiques actuellement disponibles portent sur les aspects structuraux et fonctionnels des gènes et des protéines, soit l'étude des caractéristiques des gènes et des protéines, de leur emplacement et de leurs fonctions.

Les applications de la bioinformatique aident les chercheurs de plusieurs façons :

- Les chercheurs peuvent comparer les génomes cartographiés de n'importe quelle espèce afin de définir les similitudes et les différences entre les organismes.
- Les chercheurs peuvent accéder à l'information génétique provenant des quatre coins du monde. Il existe diverses bases de données consultables, dont plusieurs sur Internet, utiles pour définir les séquences d'ADN de gènes particuliers.
- Les bases de données donnent également un accès rapide aux renseignements sur les protéines. Les chercheurs peuvent retrouver une séquence d'après le nom d'une protéine ou une protéine d'après la séquence de l'acide aminé.
- Les programmes de traduction de séquences permettent aux utilisateurs d'analyser des séquences des nucléotides. Les programmes convertissent les séquences d'ADN en séquences de protéines ou les séquences de protéines en ADN complémentaire (ADNc).

Les bioinformaticiens utilisent les outils de séquençage pour approfondir leur connaissance des caractéristiques du matériel génétique, y compris des protéines. Après avoir analysé les séquences de protéines, les chercheurs peuvent rechercher des séquences similaires dans les bases de données à l'aide de logiciels. D'autres programmes permettent aux chercheurs d'étudier les protéines et les nucléotides en trois dimensions. Comme la forme détermine essentiellement la fonction, ces programmes donnent aux chercheurs des indices sur le rôle des séquences [80].

I.10.5. Principes de la bioinformatique

Les deux thèmes majeurs de la bioinformatique sont :

- Identifier les gènes et prédire leur fonction.
- Prédire le repliement des séquences protéiques avec identification de l'activité biologique.

Pour cela la bioinformatique utilise plusieurs méthodes, dont la plus compréhensible est la comparaison de séquences [81].

I.10.6. Les méthodes utilisées par la bioinformatique

La bioinformatique recourt à trois méthodes complémentaires :

- **Méthode comparative**

Des logiciels de comparaison explorent les bases de données (séquences, structures) de gènes et de protéines déjà identifiés et annotés par d'autres équipes scientifiques pour établir des rapprochements (similarités, homologues ou identités) avec des séquences ou structures inconnues que l'on étudie et que l'on cherche à identifier.

- **Méthode statistique**

Des logiciels appliquent des analyses statistiques aux données (sur la syntaxe des séquences) pour tenter de dégager et de repérer des règles et des contraintes présentant un caractère systématique, régulier ou général.

- **Approche par modélisation**

Approche probabiliste. Elle consiste à étudier les objets (ex. : séquences, structures, motifs, etc., ...) à travers la construction d'un modèle qui tente d'en extraire les propriétés communes. La relation entre les objets d'étude (et/ou leur reconnaissance) est alors exprimée en référence à ce modèle optimal commun [81].

I.10.7. Deux types de molécules support de la bioinformation : les acides nucléiques et les protéines

I.10.7.1. Les acides nucléiques

I.10.7.1.1. ARN : Acide RiboNucléique

- macromolécule : chaîne nucléotidique
- constitué par un enchaînement d'unités élémentaires : les ribonucléotides
- forme qui permet de transférer et de traiter l'information dans la cellule
- le plus souvent formé d'un simple brin

On distingue :

- les ARN messagers ou ARNm : ils sont transcrits à partir d'un gène (ADN). Ils sont ensuite traduits en protéines ;
- les ARN de transfert ;
- les ARN ribosomiaux ;
- les ARN nucléaires ;
- les ARN cytoplasmiques [82, 83].

I.10.7.1.2. ADN : Acide DésoxyriboNucléique

- macromolécule : chaîne nucléotidique
- constituée par un enchaînement d'unités élémentaires : les désoxyribonucléotides
- forme de stockage de l'information génétique. Cette information est représentée par une suite linéaire de gènes

- formée de deux brins complémentaires enroulés en double hélice ce qui lui permet de se dupliquer en deux molécules identiques entre elles et identiques à la molécule mère

On distingue :

- l'ADN du génome du noyau ;
- l'ADN du génome mitochondrial ;
- l'ADN du génome chloroplastique [82, 83].

I.10.7.2. Protéine

- macromolécule : chaîne polypeptidique
- constitué par un enchaînement d'unités élémentaires : les acides aminés
- l'ensemble des protéines assurent les principales fonctions cellulaires
- se replie sur elle-même et adopte une conformation ou structure particulière dans l'espace. Cette structure tridimensionnelle est à l'origine de la fonction de la protéine et de la spécificité de cette fonction [82, 83].

I.10.8. Deux types de bioinformation : la séquence des nucléotides et la séquence des acides aminés

Les chaînes nucléotidiques (ADN, ARN) et les chaînes polypeptidiques (protéines) sont des polymères d'unités élémentaires :

- ADN : 4 désoxyribonucléotides = dCMP (désoxyribose Citidine Monophosphate), dGMP (désoxyribose Guanine Monophosphate), dAMP (désoxyribose Adénine Monophosphate), dTMP (désoxyribose Thymine Monophosphate).
- ARN : 4 ribonucléotides = CMP (Cytidine Monophosphate), GMP (Guanine Monophosphate), AMP (Adénine Monophosphate), UMP (Uridine Monophosphate)
- protéines : 20 acides aminés = Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Pro (P), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W), Tyr (Y).

Elles possèdent 2 extrémités distinctes et sont donc orientées :

- de l'extrémité dite 5' vers l'extrémité dite 3' pour les chaînes nucléotidiques
- de l'extrémité dite N-terminale vers l'extrémité dite C-terminale pour les chaînes polypeptidiques

En conséquence :

- les chaînes nucléotidiques et polypeptidiques sont une succession ordonnée et orientée d'unités élémentaires ;
- les séquences sont leur transcription sous forme d'une succession ordonnée et orientée de lettres qui correspondent à ces unités élémentaires [82, 83].

I.10.9. Les banques de séquence biologique

Il existe un grand nombre de bases de données d'intérêt biologique. Nous nous limiterons ici à une présentation des principales banques de données publiques, basées sur la structure primaire des séquences, qui sont largement utilisées dans l'analyse informatique des séquences [84].

Nous distinguerons deux types de banques, celles qui correspondent à une collecte des données la plus exhaustive possible et qui offrent finalement un ensemble plutôt hétérogène d'informations et celles qui correspondent à des données plus homogènes établies autour d'une thématique et qui offrent une valeur ajoutée à partir d'une technique particulière ou d'un intérêt suscité par un groupe d'individus [84].

En biologie, il est fréquent d'appeler les premières "banques de données" et les secondes "bases de données", mais cette distinction n'est pas universelle en dehors du domaine biologique. Aussi, pour éviter toute confusion sémantique nous parlerons ici de banques de données ou bases de données généralistes (pour les premières) et spécialisées (pour les secondes) [84].

I.10.9.1. Historique

C'est au début des années 80 que les premières banques de séquences sont apparues sous l'initiative de quelques équipes comme celle du Professeur Grantham à Lyon [85]. Très rapidement avec les évolutions techniques du séquençage, la collecte et la gestion des données ont nécessité une organisation plus conséquente. Ainsi, plusieurs organismes ont pris en charge la production de telles bases de données.

En Europe, financée par l'**EMBO** (European Molecular Biology Organisation), une équipe s'est constituée pour développer une banque de séquences nucléiques (EMBL data library) et en assurer la diffusion [86]. Cette équipe travaille au sein du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire qui est longtemps resté à Heidelberg et qui se trouve actuellement près de Cambridge au sein de l'EBI (European Bioinformatics Institute).

Du côté américain, soutenue par le **NIH** (National Institute of Health) une banque nucléaire nommée GenBank a été créée à Los Alamos [87]. Cette base de données était distribuée par la société IntelliGenetics et est diffusée maintenant par le NCBI (National Center for Biotechnology Information).

La collaboration entre ces deux banques a commencé relativement tôt. Elle s'est étendue en 1987 avec la participation de la **DDBJ** (DNA Data Bank) du Japon pour donner naissance finalement en 1990 à un format unique dans la description des caractéristiques biologiques qui accompagnent les séquences dans les banques de données nucléiques (The DDBJ/EMBL/GenBank feature table : Definitions, 1999).

Parallèlement, pour les protéines, deux banques principales ont été créées. La première, sous l'influence du National Biomedical Research Foundation (**NBRF**) à Washington, produit maintenant une association de données issues du **MIPS** (Martinsried Institute for Protein Sequences), de la base Japonaise **JIPID** (Japan International Protein Information Database) et des données propres de la **NBRF**.

Elle se nomme la Protéine Identification Ressource (PIR-NBRF) [88]. La deuxième, Swissprot a été constituée à l'Université de Genève à partir de 1986 et regroupe entre autres des séquences annotées de la PIR-NBRF ainsi que des séquences codantes traduites de l'**EMBL** [89, 90].

I.10.9.2. Le stockage de la bioinformation : les banques de données

Les fichiers contenant l'information biologique sous la forme de séquences est l'élément central autour duquel les banques de données se sont constituées. Il existe un grand nombre de bases de données d'intérêt biologique. On peut distinguer :

- les banques de données ou bases de données généralistes : elles correspondent à une collecte des données la plus exhaustive possible et qui offrent un ensemble plutôt hétérogène d'informations
- les bases de données ou bases de données spécialisées : elles correspondent à des données plus homogènes établies autour d'une thématique et qui offrent une valeur ajoutée [83].

1. Exemple de grandes banques généralistes :

- **EMBL** : Banque européenne créée en 1980 et financée par l'**EMBO** (European Molecular Biology Organisation). Elle est aujourd'hui diffusée par l'**EBI** (European Bioinformatics Institute, Cambridge)
- **Genbank** : Créée en 1982 par la société IntelliGenetics et diffusée maintenant par le **NCBI** (National Center for Biotechnology Information, Los Alamos)

- DDBJ (DNA Data Bank of Japan) : Créée en 1986 et diffusée par le **NIG** (National Institute of Genetics, Japon).

Ces trois banques s'échangent systématiquement leur contenu depuis 1987 et adoptent un système de conventions communes (The **DDBJ/EMBL/GenBank** Feature Table Definition).

- PIR-NBRF (Protein Identification Ressource) : banque de protéines créée sous l'influence du **NBRF** (National Biomedical Research Foundation) à Washington. Elle diffuse maintenant des données issues du **MIPS** (Martinsried Institute for Protein Sequences), de la base Japonnaise **JIPID** (Japan International Protein Information Database) et des données propres de la **NBRF**.
- Swissprot : elle a été constituée à l'Université de Genève à partir de 1986 et regroupe entre autres des séquences annotées de la **PIR-NBRF** ainsi que des séquences codantes traduites de l'EMBL [83].

2. Exemple de banques spécialisées :

- Disulfide Bridge DataBase (J.-M. Richer, G. Hunault & E. Jaspard) : Cette base de données contient un grand nombre d'informations structurales sur les cystéines de plus de 400 protéines cristallisées. Elle a aussi pour but de servir à la mise au point d'un logiciel de prédiction des cystéines impliquées dans la formation de pont disulfure.

LEADB (G. Hunault, L. Châtelain & E. Jaspard) : Cette base de données contient un grand nombre d'informations sur les "Late Embryogenesis Abundant proteins". Elle a pour but d'étudier la relation structure - fonction de ces protéines impliquées entre autre dans la protection contre les stress biotiques et abiotiques [83].

Le tableau 2 retrace les grandes étapes de la bioinformatique, et montre à quel point cette discipline a accompagné et souvent précédé le développement des concepts biologiques et des outils informatiques sur laquelle elle est fondée.

1951 Première séquence protéique

1960 Lien entre séquence & structure

1965 Premier Ordinateurs IBM/360

1965 "Evolutionary divergence and convergence in Proteins"

1967 "Construction of Phylogenetic Trees.

1968 Atlas of Protein Sequences

1968 mini-ordinateur DEC PDP-8

1970 "A general method applicable to the search for similarities in sequences of two proteins"

1971 Premier travaux sur le repliement des ARNs (J. Ninio)

1972 Premier microprocesseur Intel 8008

1973 "Génie Génétique" (Cohen et al.)

1974 "Prediction of Protein Conformation" (Chou & Fasman)

1975 Intel 8080, kit Altair

1977 mini-ordinateur DEC-VAX.

Micro-ordinateurs (Apple, Commodore, Radioshack)

Séquençage d'ADN (Sanger, Maxam, Gilbert)

1977 Premier "package" bioinformatique

1978 Bases de données : ACNUC, PIR, EMBL, GenBank

1980 Accès téléphonique à la base de données PIR

1981 IBM-PC (8088), 16-32kb

1981 Los Alamos-GenBank : 270 séquences, 370.000 nucléotides

Programme d'alignement local (Smith-Waterman)

1983 IBM-XT Disque DUR (10 Mbytes)

1984 MacIntosh : interface graphique & souris

1985-88 Programme "Fasta" (Pearson-Lipman)

1989 INTERNET succède à ARPANET et BITNET

1990 Programme "Blast"

1990 Clonage positionnel et séquençage de NF-1

1991 "Grail", programme performant pour localiser les gènes (Mural et al.)

1991 Étiquettes d'ADNc "EST" 1992 Séquençage complet du chromosome III de levure

1995 Première séquence complète d'un micro-organisme

1996 Séquence complète de la levure

1997 Programme "Gapped Blast" 1997 11 génomes bactériens disponibles

1998 2 Mbase/jour de nouvelles séquences publiques [82, 83].

I.11. L'antibiogramme

Un antibiogramme consiste à évaluer un antibiotique vis-à-vis des traitements possibles chez un patient, d'où son intérêt médical.

Une souche est dite sensible à un antibiotique si sa croissance peut être réduite par un traitement à base d'antibiotique.

Une souche est dite intermédiaire à un antibiotique si elle n'est pas atteinte par un traitement standard, mais si une augmentation de la dose d'antibiotique permet de détruire ce germe.

Une souche est dite résistante à un antibiotique si elle ne peut être atteinte par ce traitement, même en augmentant les doses d'antibiotique.

I.11.1. Le but de l'antibiogramme

Effectuer un antibiogramme permet de déterminer la "sensibilité" d'une souche de bactéries vis-à-vis de divers antibiotiques. L'interprétation des résultats est très simple, ce qui explique son intérêt.

Toutefois, il reste une part d'inconnu dans la mesure où les tests sont effectués *in vitro*. La sensibilité d'une souche *in vitro* ne se retrouve pas toujours chez le patient pour des raisons de diffusion tissulaire, de mauvaises absorptions intestinales... C'est toujours à l'examen clinique de confirmer l'antibiogramme [91].

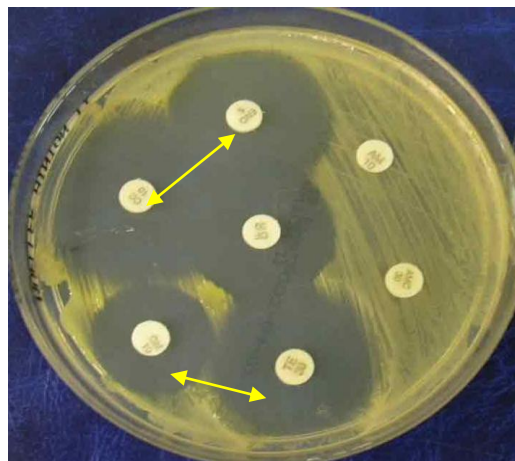
I.11.2. Réalisation d'un antibiogramme

I.11.2.1. Principe général

Pour réaliser l'antibiogramme par la méthode des disques, la culture bactérienne est ensemencée à la surface d'une gélose spécialement étudiée. Des disques pré-imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits [91].

I.11.2.2. Technique

En pratique, on réalise à partir de l'isolement (souche pure) un ensemencement en tapis sur le milieu. On dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place à l'incubateur. Au bout de 24 h, on lit les différents diamètres d'inhibition (figure15) [91].



II.1. Objectifs

Nous avons utilisés les deux serveurs (EMBL et NCBI), qui contiennent des banques génomiques contenant toutes les séquences nucléiques.

Nous avons essayés de chercher le motif Taleb/Fromm, AAA(C) X_n (A/C/G) CGCG(C/G/T), Qui se trouve dans la région promotrice et qui est responsable à la réponse aux stress environnementaux.

II.2. L'utilisation du serveur NCBI

Le **NCBI** (National Center for Biotechnology Information) maintient, en collaboration avec d'autres organisations internationales, un certain nombre de bases de données, comme PubMed pour la littérature scientifique, GenBank pour les séquences nucléiques ou OMIM pour les maladies génétiques.

GenBank est une banque généraliste qui contient l'ensemble des séquences nucléiques, quelle que soit leur nature (ADN génomique, ARN messenger, EST).

Pour trouver les séquences nucléiques, on a utilisé le moteur de recherche **Google**, où on fait entrer le mot clef NCBI. A partir de la page d'accueil de ce serveur nous pouvons accéder au site internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en cliquant sur National Center for Biotechnology Information comme le montre la figure 17. Sur le coté gauche de la première page web de NCBI on trouve les ressources dont : NCBI home, All ressources (A-Z), Literature,..., Sequence analysis, genes & expression,..., ect. On clique sur Sequence analysis dont on obtient une deuxième page web, à gauche/haut de cette dernière il y a aussi deux cases vides, la première case il y a des liens vers d'autres services de NCBI dont : All Databases, NCBI Web Site, Databases,..., Nucleotides,...ect, on clique sur nucleotide. Dans la deuxième case on fait entrer le nom de l'enzyme responsable de la biosynthèse des tanins (figure 18).

En cliquant search on obtient la page web qui renferme tous les résultats des différents séquences nucléiques qui existent dans cette banque.

En suite on clique sur chaque séquence nucléique dont on obtient tout les résultats qui concerne le gène responsable à la biosynthèse des tanins qui se trouve dans la région promotrice (figure19).

Dans la deuxième étape, on va utiliser un logiciel d'alignement (NCBI blast), pour but de localiser le motif étudié dans la séquence nucléique qu'on a déjà trouvé dans la première étape.

II.3. L'utilisation de logiciel d'alignement (NCBI BLAST)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) version du NCBI (**National Center for Biotechnology Information**) regroupe un ensemble de programmes permettant de rechercher des séquences similaires dans une banque de séquences (database) des séquences similaires à partir d'une séquence de requête de protéine ou d'ADN.

Les programmes BLAST ont été développés en misant principalement sur la rapidité mais en sacrifiant sur la sensibilité. Ces programmes utilisent un algorithme heuristique qui recherche les similitudes locales ce qui leur permet de d'apparier des séquences qui ne partagent que des régions isolées de similitude.

On a utilisé le moteur de recherche **Google** pour le site de NCBI BLAST, on clique sur cette dernière (figure 20) pour arriver à la deuxième page web.

En suite on clique sur Align (figure21) pour obtenir la page web où il y a deux cases vides, dans la première case (dessus) on introduit la séquence nucléique et dans deuxième case (dessous) on fait entrer le motif qu'on a déjà trouvée dans la première étape. Puis on clique sur BLAST (figure22).

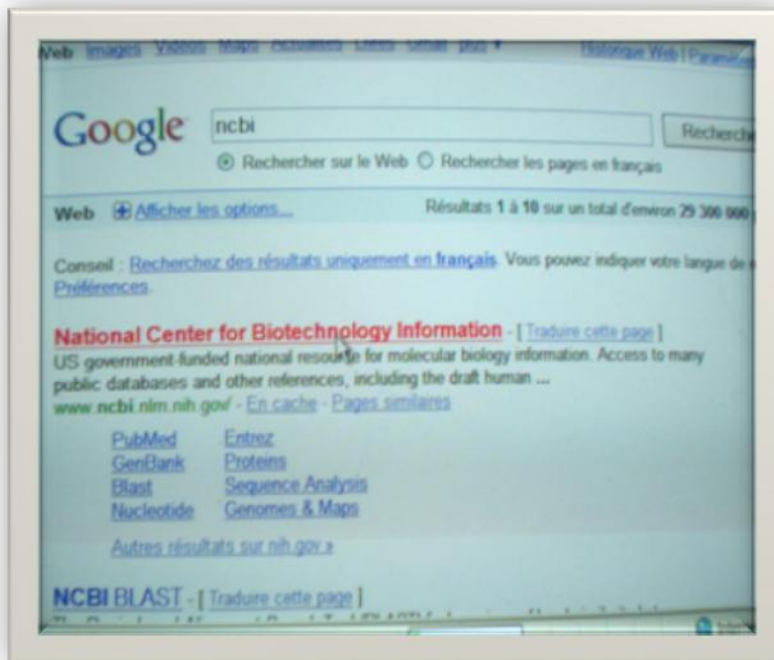


Figure17. (Source: http://www.google.com/search?hl=fr&source=hp&q=ncbi&lr=&aq=f&aqi=n1g10&aql=&oq=&gs_rfai=).

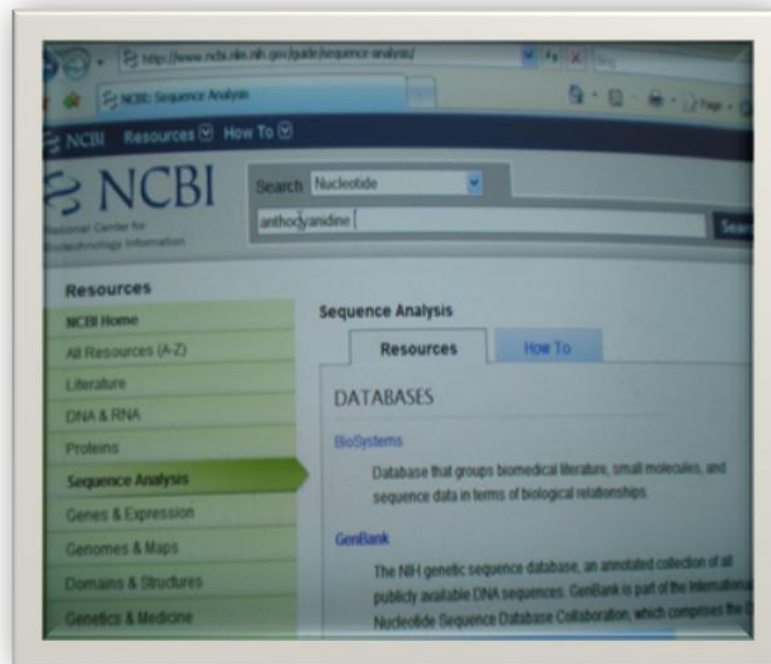


Figure18. (Source: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>).

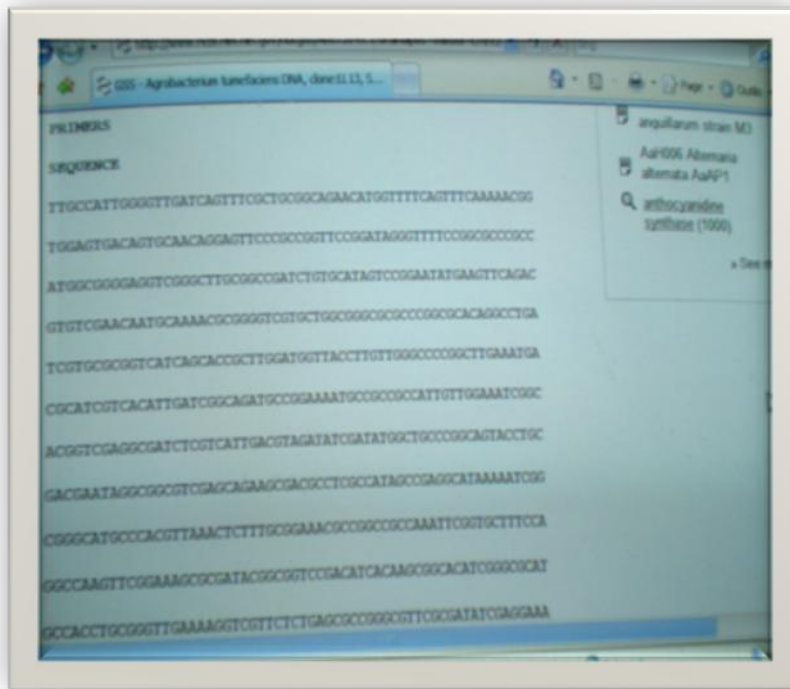


Figure19.(Source:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucgss&term=anthocyanidine+synthase+promotrice +region&report=docsum).

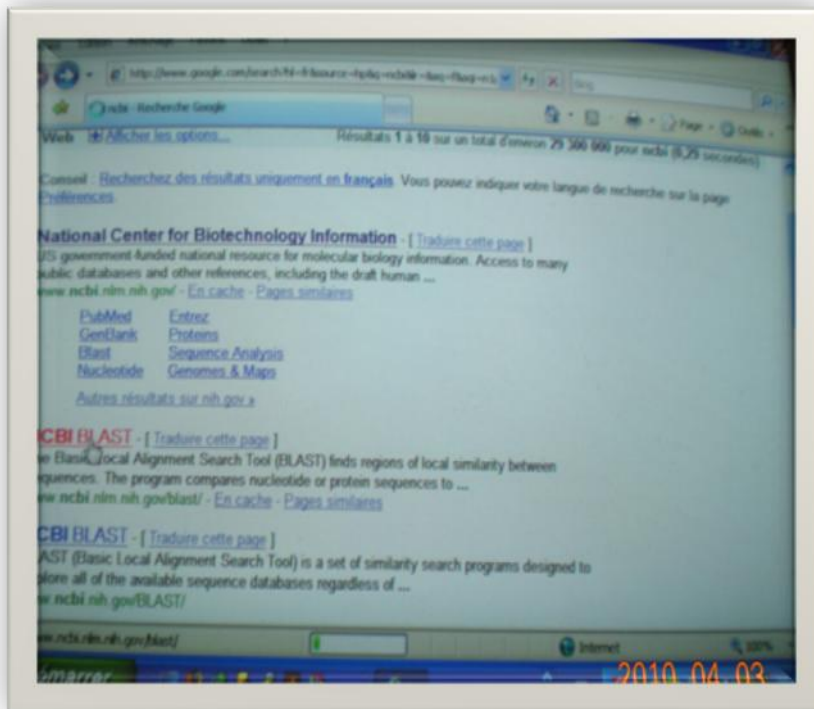


Figure20.(Source:http://www.google.com/search?hl=fr&source=hp&q=ncbi+blast&lr=&aq=f&aqi=g8&aql=&oq=&gs_rfai=).

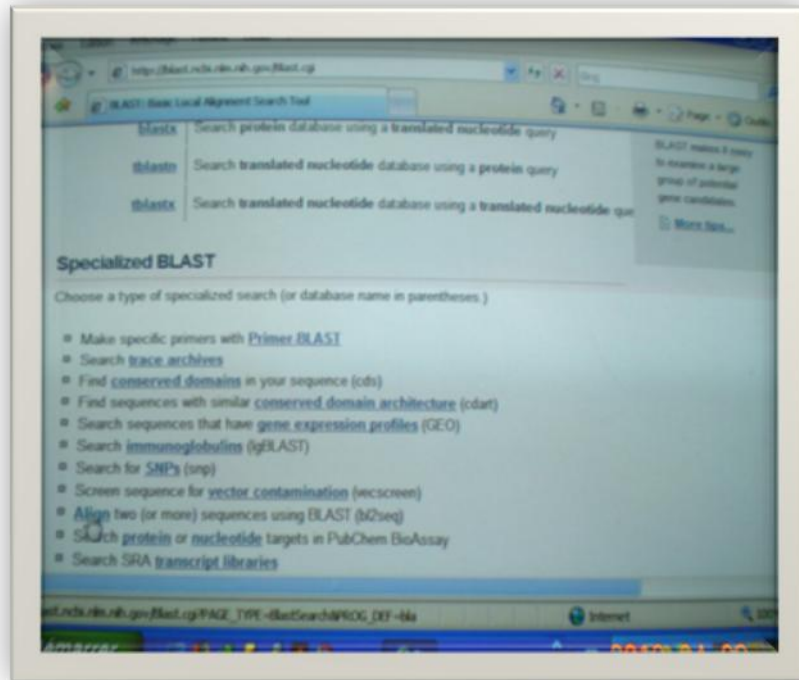


Figure21. (Source: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

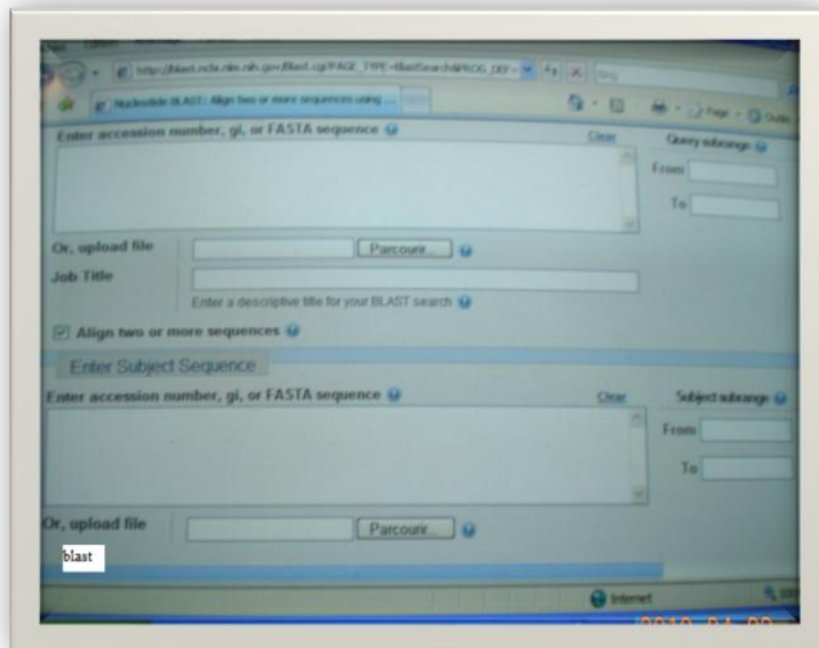


Figure22. (Source: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=blastSearch&PROG_DEF=tbla&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq).

II.4. L'utilisation du serveur EMBL

EMBL est une base de données de séquences nucléiques (**EMBL-Bank**), créée en 1980 par l'EMBL (European Molecular Biology Laboratory), est maintenue à l'EBI (European Bioinformatics Institute), EMBL et GenBank ont travaillé en collaboration.

GenBank fait partie de la collaboration internationale de base de données (Database) de séquences nucléiques, qui comporte la banque de données d'ADN du Japon (DDBJ), du laboratoire de biologie moléculaire européen (EMBL).

On a utilisé le moteur de recherche **Google**, où on a fait entrer le mot clés EMBL (figure 23). A partir de la page d'accueil de ce serveur nous pouvons accéder au site internet (<http://www.embl.de/>), sur le côté gauche/haut de la première page web de EMBL on trouve une case vide où on fait entrer le mot clés séquence, On clique sur **search** (figure 24).

Dans la deuxième page web de EMBL il y a des liens vers d'autres services tel que : ADAN, BLAST2SRS, EMBL Nucleotide Sequence Database,..., ect, on clique sur EMBL Nucleotide Sequence Database (figure 25) dont on obtient une troisième page web qui contient deux case vide en haut de la page. La première case (gauche) contient toutes les bases de données de séquences nucléiques, et dans la deuxième case on va introduire le nom de l'enzyme responsable à la biosynthèse des tanins (figure 26).

En cliquant **GO** on obtient la page web qui renferme tous les résultats des différentes séquences nucléiques qui existent dans cette banque, on a trouvé des résultats sur les génomes, nucleotide sequenses, proteine sequenses,..., gene expression,...ect (figure 27).

Pour trouver les séquences nucléiques on clique sur nucleotide sequenses, dans laquelle on va arriver à la page web qui contient tout les résultats des séquences nucléiques des tanins (figure 28).

En suite on clique sur chaque séquence nucléique dont on obtient tout les résultats qui concerne le gène responsable à la biosynthèse des tanins (figure 29).

II.5. L'utilisation de logiciel d'alignement (EMBL BLAST)

BLAST est utilisé pour comparer une nouvelle séquence avec celles contenues dans les bases de données de nucléotides et protéines en alignant la nouvelle séquence avec des gènes déjà caractérisés.

L'accent de cet outil est de trouver les régions de la similarité de séquence, ce qui donnera des indices et de l'évolution fonctionnelle de la structure et la fonction de cette séquence.

Régions de similarité détectée par ce type d'outil d'alignement peut être soit local, où la région de similitude est basée à un endroit, ou mondiale, où les régions de similitude peut être détectée dans le code génétique indépendants autrement.

Pour arriver au site de EMBL BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>) On a utilisé le moteur de recherche **Google**, puis on a choisi Bioinformatics Tools | Sequence Analysis, Homology Searches ..., en suite on clique sur Sequence Analysis puis sur Align pour obtenir la page web où il y a deux cases vides, dans la première case (dessus) on introduit la séquence nucléique et dans deuxième case (dessous) on fait entrer le motif qu'on a déjà trouvée dans la première étape. Puis on clique sur Run.

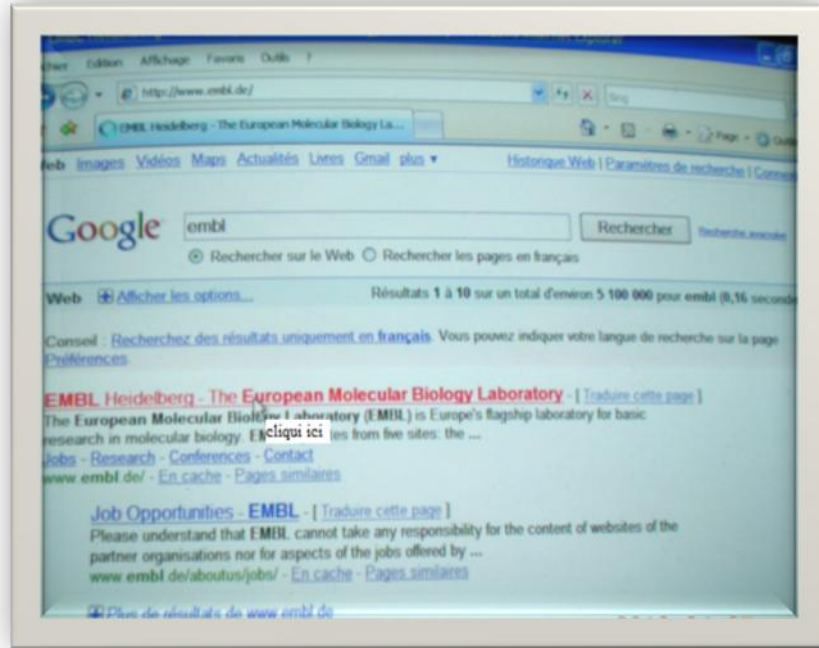


Figure23. (Source : http://www.google.com/search?hl=fr&source=hp&q=embl&lr=&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs_rfai=).

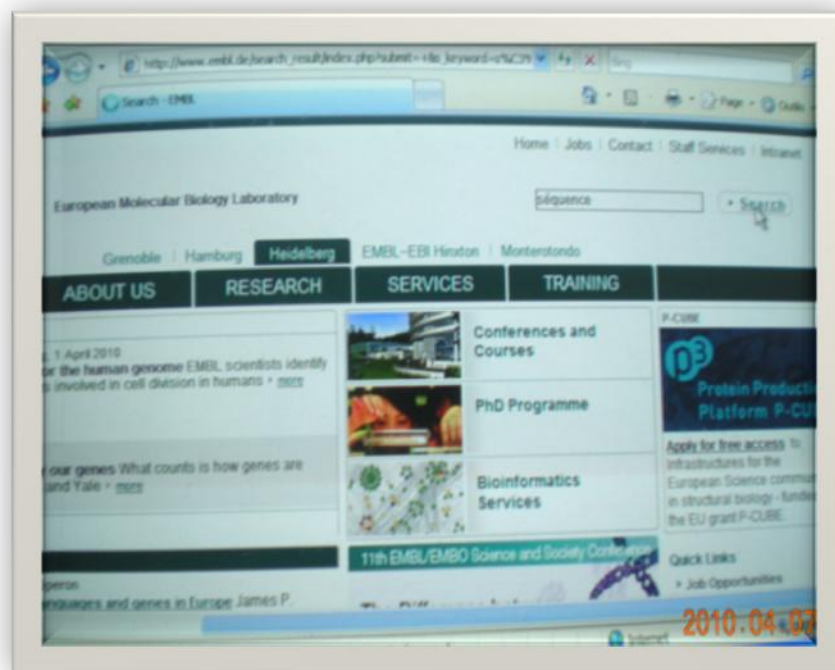


Figure24. (Source : <http://www.embl.de/>).

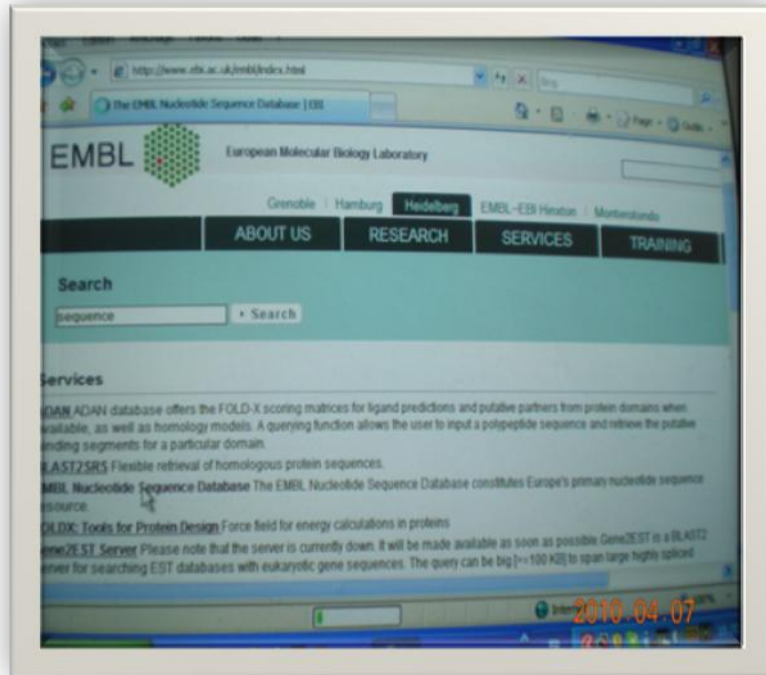


Figure25. (Source : http://www.embl.de/search_result/index.php?s_keyword=sequence).

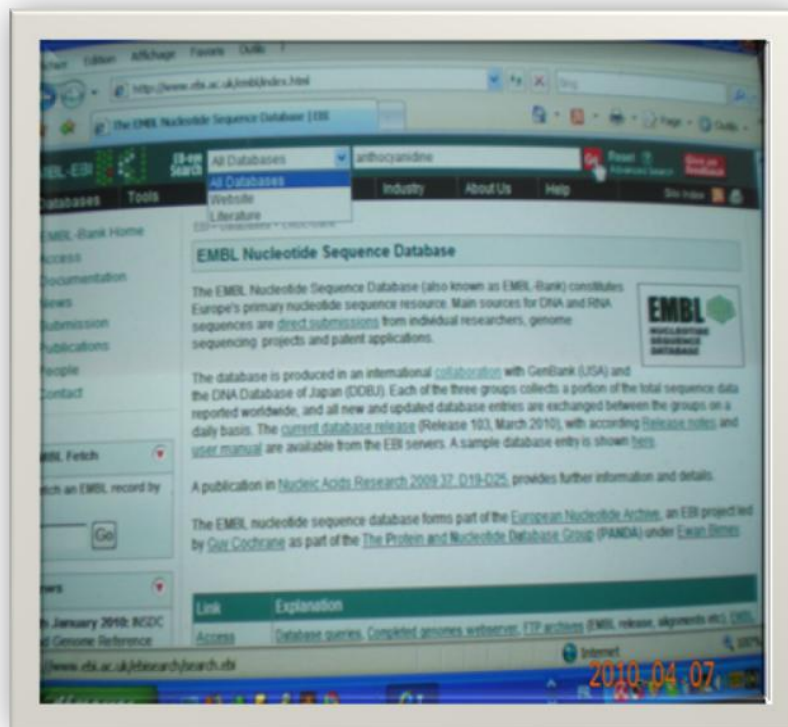


Figure26. (Source : <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>).

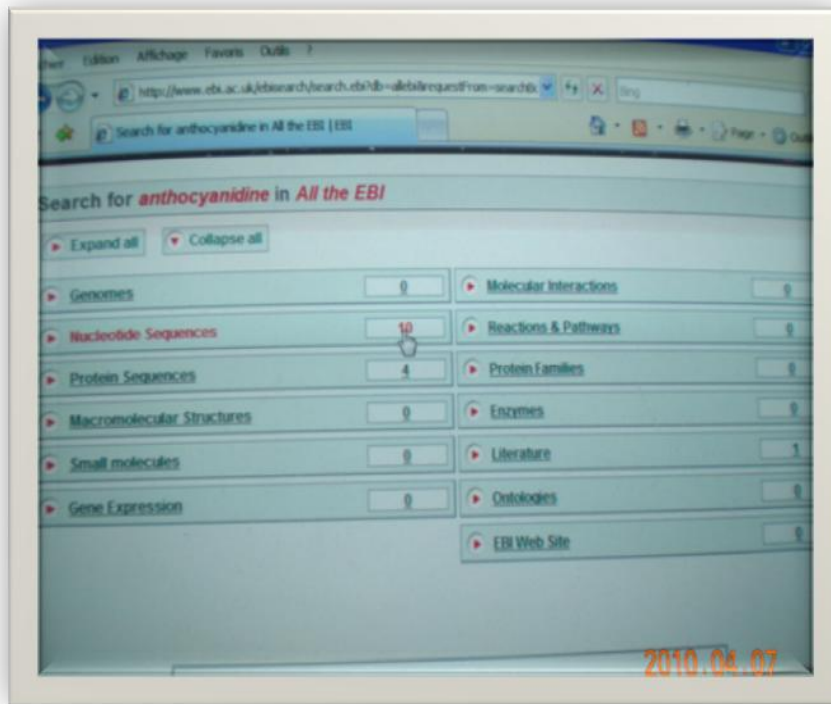


Figure27. (Source: <http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=all&requestFrom=searchBox&query=anthocyanidine&FormsButton3=Go>).

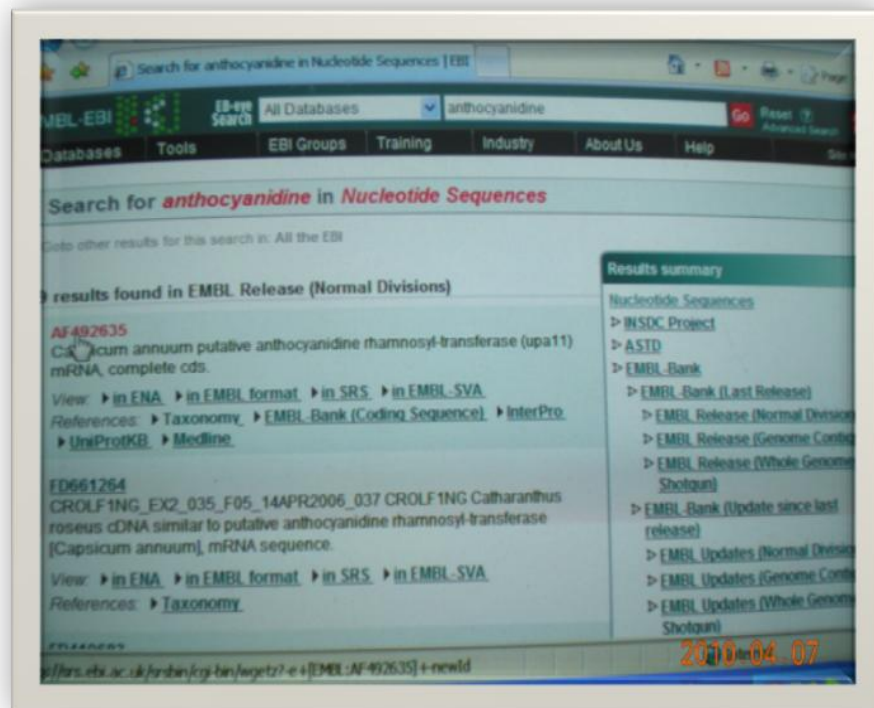


Figure28. (Source: <http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=nucleotideSequences&t=anthocyanidine>).

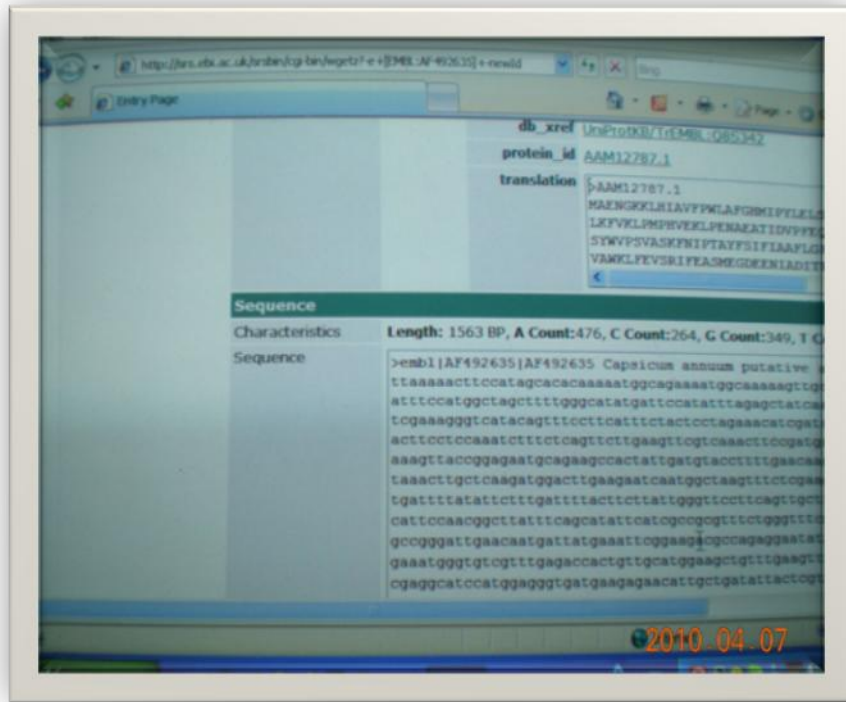


Figure29. (Source: [http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:AF492635\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:AF492635]+-newId)).

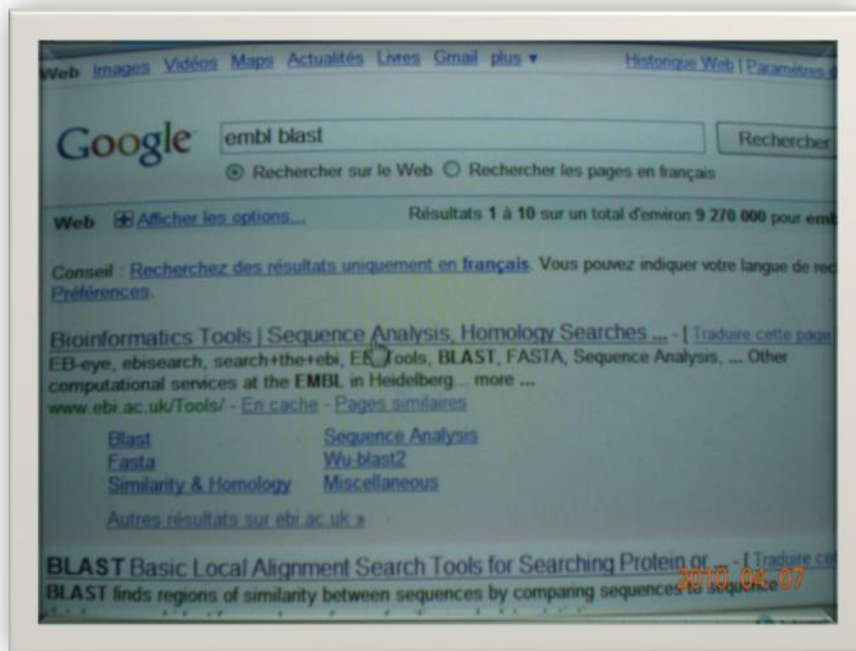


Figure30. (Source: http://www.google.com/search?hl=fr&source=hp&q=EMBL+BLAST&lr=&aq=f&aqi=&aql=&oq=&gs_rfai=).

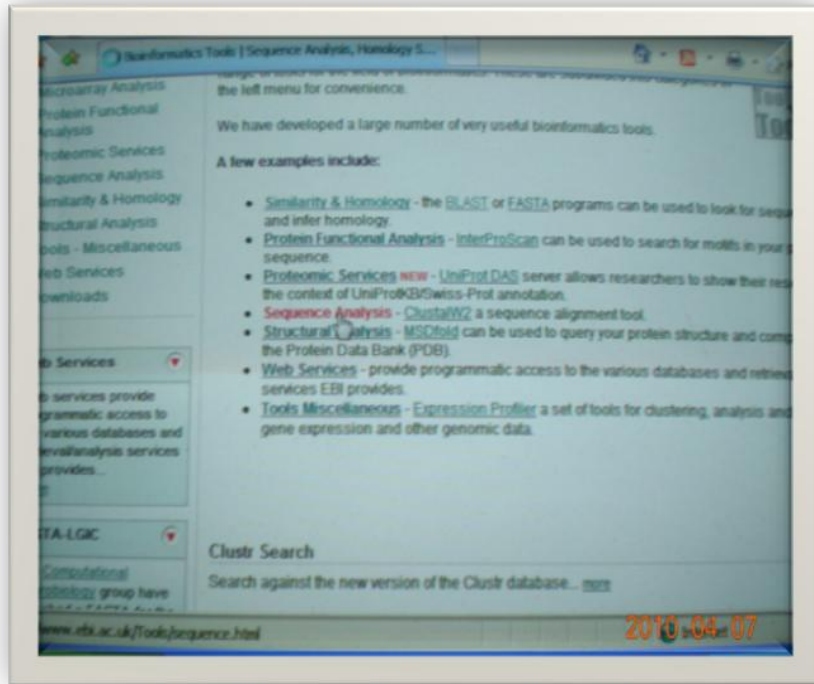


Figure31. (Source: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html>).

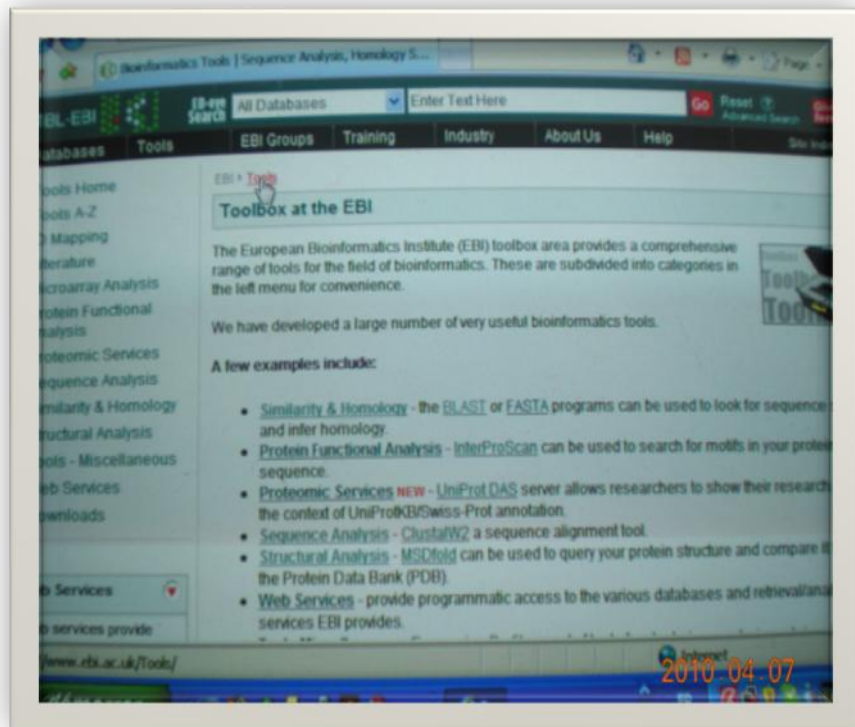


Figure32. (Source: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/>).

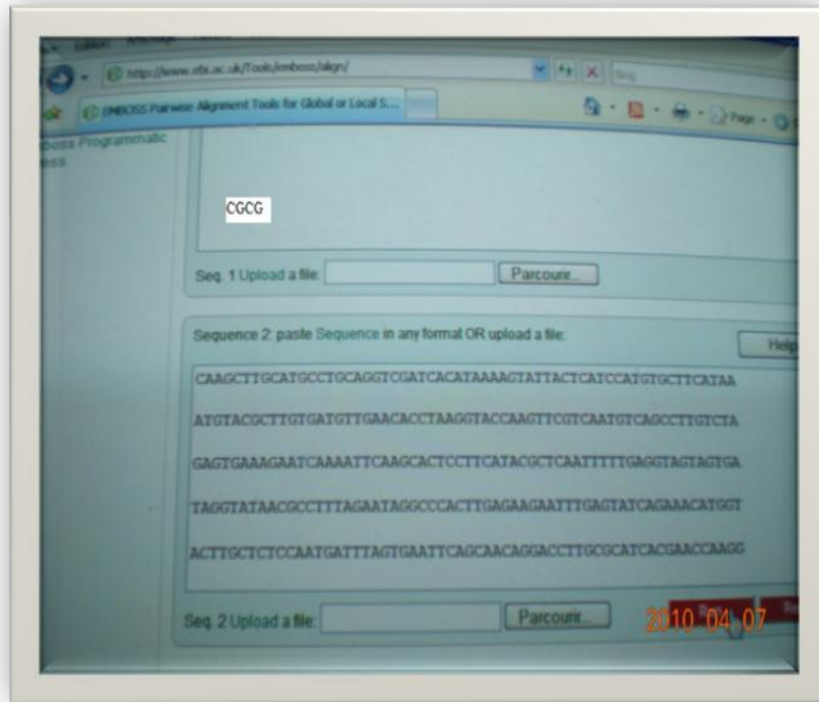


Figure33. (Source: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>).

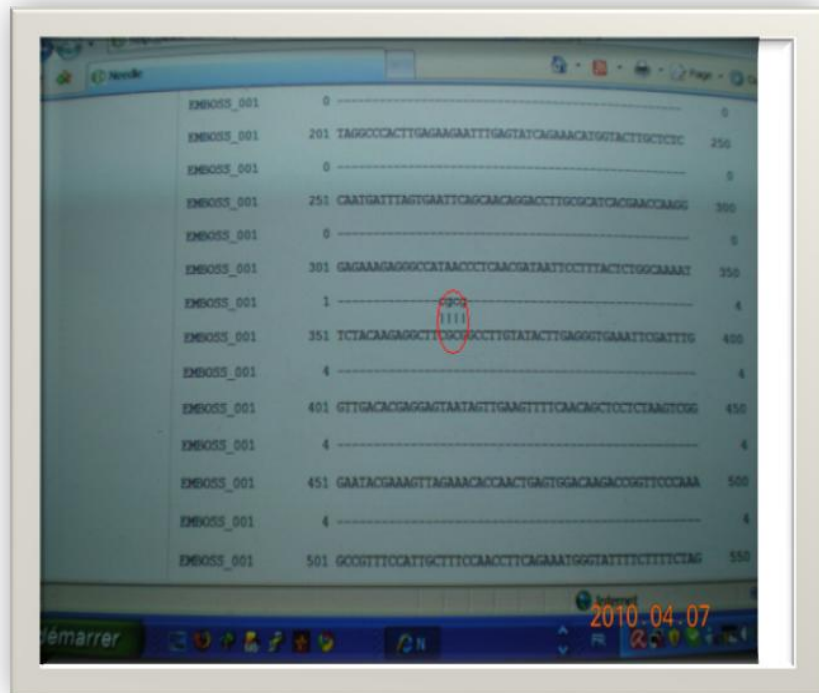


Figure34. (Source: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/jobresults.cgi/needle/needle-20100416-143337902.html>).

II.6. Les plantes médicinales

II.6.1. Généralités

Aujourd'hui, la thérapeutique continue de recourir aux plantes de deux façons :

1. pour l'extraction industrielle de substances naturelles pures, destinées le plus souvent à des indications thérapeutiques majeures : prise en charge de la douleur (morphine), traitement des cancers (paclitaxel, vinblastine), traitement du paludisme (artémisinine), etc.
2. en nature ou sous la forme de médicaments familiales simples ou plus innovantes (poudres, extraits, etc.), généralement utilisées dans les pathologies mineures ou en thérapeutique d'appoint : c'est le champ actuel de la phytothérapie.

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés particulières bénéfiques pour la santé humaine voire animale.

Si l'on y ajoute leurs vertus réparatrices, tonifiantes, sédatives, revitalisantes ou immunologiques, on mesure mieux l'aide précieuse qu'elles sont susceptibles de nous apporter au quotidien.

II.6.2. Les plantes médicinales choisie

Avant que nous avons commencés notre étude microbiologique nous avons semés différentes graines de plusieurs espèces telle que : le romarin, le thym, le basilic, le persil (normale et frisé), la lavande, la camomille, mais les espèces poussait sont :

- Le thym ;
- Le persil ;
- Le basilic.

II.6.2.1. Le basilic

Le nom scientifique du Basilic est *Ocimum basilicum*. Cette plante aromatique appartient à la famille des lamiacées. Elle aime grandir dans des terres chaudes à l'abri du vent. Mais le basilic supporte bien la culture en pot, ainsi, vous pouvez tout à fait posséder votre pied de basilic chez vous [92].

La plante de basilic peut mesurer jusqu'à 60 centimètres. La culture du basilic nécessite un climat chaud et ensoleillé de type méditerranéen ou tropical. Il craint le froid et ne résiste pas si la température descend en dessous de 10 °C [92].

Le basilic contient de bonne quantité de vitamine K qui agit sur la stimulation et l'inhibition de la coagulation sanguine et la formation des os (figure35) [92].

- **Les principes actifs**

On retrouve plusieurs composés antioxydants dans le basilic, mais les fines herbes de manière générale ne sont jamais consommées en quantité suffisante pour procurer les bienfaits qu'on leur attribue. Toutefois, l'ajout de basilic aux aliments de manière régulière contribuera, même si faiblement, à l'apport en antioxydants de l'alimentation [93].

L'antioxydant que l'on retrouve en grande quantité dans les feuilles de basilic est l'acide rosmarinique. Cette molécule a la faculté d'agir de manière combinée avec la vitamine E, ce qui augmente la capacité antioxydante globale des deux molécules. On retrouve aussi dans le basilic plusieurs autres acides phénoliques et des flavonoïdes qui possèdent des propriétés antioxydantes [93].

- **Constituants**

- **Huile essentielle :** linalol, estragol (= méthylchavicol), eugénol, monoterpènes (ocimène, cinéole...), sesquiterpènes et dérivés phénylpropaniques (méthylcinnamate)

- **Autres constituants :** tanins, flavonoïdes (hétérosides du quercétol et du kaempférol), acide caféique, esculoside [93].

- **Effets thérapeutiques d'huiles de basilic :**

- Idéal comme tonique de nerf ;
- Pour soulever la fatigue, l'inquiétude et la dépression ;
- En outre bon pour que la bronchite, les colds, la fièvre, la goutte et l'indigestion et réputé apaise des morsures de serpent [94].

- **Utilisations d'huiles de basilic :**

- Inhalation ;
- Bath ;
- Massages ;
- Combiné avec d'autres huiles telles que le thym, elle agit également en tant qu'antiseptique puissant[94].

- **Rôle du basilic**

- o Augmente la tonicité musculaire ;

- o Potentialise les propriétés anti-inflammatoires des autres éléments actifs de cette formule [94].

- Effet thérapeutique**

La molécule du basilic possède de nombreux effets pharmacologiques. Elle est reconnue comme ayant des propriétés anti-tumorales, hépatoprotectrice, anti-inflammatoire, anti-ulcéreux et antimicrobien. Ce sont ses effets préventifs pour le cancer et comme anti-inflammatoire qui ont démontré le potentiel le plus impressionnant.

Cette molécule permet l'inhibition de l'enzyme élastase, chargé de dégrader l'élastine. Cela explique aussi son effet au niveau de la santé de la peau. De plus, elle inhibe aussi les enzymes 5- lipogénase et cyclo-oxygénase. La molécule du basilic est utilisée pour améliorer la santé et la force des cheveux, ainsi que pour éviter leur perte [94].

II.6.2.2. Le thym

Thymus est un genre de plantes (couramment appelées thym) de la famille des Lamiacées. Ce genre comporte plus de 300 espèces. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes aromatiques[95].

La principale huile essentielle de *Thymus vulgaris* est un terpénoïde qui lui doit son nom, le thymol, une substance bactéricide. Dans le sud de la France, le thym est aussi fréquemment appelé farigoule (de son nom occitan : farigola) (figure36) [95].

- **Principes actifs majeurs**

La tige fleurie de thym contient essentiellement des flavonoïdes (dérivés de l'apigénol et du lutéolol) et des acides-phénols (notamment caféique et rosmarinique), des tanins, une résine, et surtout une huile essentielle (très riche en deux phénols isomères : le thymol et le carvacrol) qui lui vaut la plupart de ses propriétés [96].

- **Propriétés générales essentielles**

La tige de thym possède surtout des propriétés :

- antiseptique ;
- antispasmodique et antitussive ;
- eupeptique, cholagogue et cholérétique ;

- dépurative ;
 - cicatrisante (en usage externe) [95].
- **Indication principales**
Actuellement, le thym est principalement utilisé :

En général :

- Dans le traitement des maladies infectieuses (notamment la grippe), et des affections liées à un refroidissement (comme par exemple le coryza aigu).
- Pour activer ou faciliter les fonctions digestives, tout particulièrement le travail du foie et de la vésicule biliaire.

En particulier :

- Sphère respiratoire : Affections broncho-pulmonaires dans leur ensemble - Toux.
- Sphère digestive : Anorexie - Digestion lente ou difficile - Parasitoses intestinales : ascaridiose et oxyurose).
- Sphère dermatologique (en usage externe) : Chute anormale ou prématurée des cheveux – Certaines dermatoses.

II.6.2.3. Le persil

Le persil est une plante potagère et médicinale. Il est chaud et dessiccateur, atténuant, apéritif, détersif, diurétique et hépatique.

Son principal usage est dans l'obstruction du poumon, du foie, de la rate, des reins, de la vessie, la jaunisse, la cachexie, le calcul, la gravelle, la suppression d'urine.

Les feuilles de Persil sont résolutive et vulnérables c'est pourquoi on les applique avec grand succès sur les coupures si profondes qu'elles soient ; et sur les contusions après les avoir froissées entre les doigts (figure37) [97].

- **Composition**

C'est une plante riche en huiles essentielles dont l'apiol (également appelé camphre de persil, présent dans les graines), accompagné de myristicine. Elle contient un glucoside flavonique, l'apiine ou apioside, dont l'aglycone est l'apigénine.

Les feuilles sont riches en vitamines A et C. Il contient aussi des vitamines B ainsi que de nombreux sels minéraux et oligo-éléments : potassium, calcium, phosphore, manganèse et fer assimilables par l'organisme. Le manganèse stimule la fonction dépurative du foie et est donc utile pour faire baisser le taux de cholestérol [97].

- **Bienfaits et vertus**

L'huile essentielle de persil feuilles se recommande pour ses vertus antiépileptiques. Riche en vitamines, c'est également un bon antiseptique à utiliser en cas d'infections urinaires. Sous forme de cataplasmes, l'huile essentielle de persil feuilles soulage les plaies et les piqûres d'insectes [98].

- **Indications du persil**

Cystite (racine), rhumatismes (racine ou feuille), cure pour "détoxifier les reins" (feuilles), contre les douleurs menstruelles (racine), colique (en huile essentielle), flatulences (en huile essentielle), ménopause (feuilles fraîches, en complément), mauvaise haleine (mâcher les feuilles fraîches) [98].



Figure 35. Le basilic.



Figure 36. Le thym.



Figure 37. Le persil.

II.6.3. Mode opératoire

Après la germination des trois espèces que nous avons choisies (le thym, le persil et le basilic) et quand les plantes prennent une hauteur maximale nous les exposons au différent stress (le froid, eau saline, eau mazoutée et obscurité) pendant six jours.

Nous avons placés quelques pots de chaque espèce dans le réfrigérateur à la température de 4°C et à l'obscurité, après 24heures nous avons remarqués que les feuilles ont commencées de se faner, c'est pourquoi nous avons arrêté le stress (figure 38).

Pour le stress de l'obscurité nous avons placés les pots de chaque espèce dans une boîte en carton à la température ambiante (figure 39).

Pour le troisième stress nous avons arrosés les plantes par une eau saline de concentration 7g/l, pendant six jours (figure 40).

Le dernier c'est le stress par eau mazoutée, nous avons pris un volume de 1ml de mazoute dans 1l et nous avons arrosés les plantes pendant six jours (figure 41).

Enfin, nous avons laissés quelques pots de chaque espèce à l'état normal comme témoins (figure 42).

Après une semaine de stress nous avons découpés toute la partie aérienne (tige et feuille), ensuite nous avons les pesés et posés à l'abri du soleil pour les faire sécher (figure 43). Quand les feuilles ont été totalement séchées nous avons les pesés pour une deuxième fois, puis nous avons les broyés pour les réduire en poudre.



Figure 38. Les trois espèces placées dans un réfrigérateur à 4°C.



Figure 39. Basilic sous l'obscurité.



Figure 40. Basilic arrosé par l'eau saline.



Figure 41. Basilic arrosé par l'eau mazoutée.



Figure 42. Le thym à l'état normal (témoins).



Figure 43. Le séchage des plantes.

II.6.4. Méthode d'extraction

II.6.4.1. Evaporation à sec

La poudre obtenue est récupérée pour préparer des solutions en décoction par extraction en solution aqueuse, les extraits obtenus sont récupérés dans des boîtes de pétri de poids connus à vide.

En suite, nous avons mis toutes les boîtes dans l'étuve à 45°C jusqu'à évaporation de toutes les solutions pour les récupérer puis les pesées (figure 44).

À partir de la poudre obtenue nous avons préparés des solutions de concentration de 50mg/ml avec de l'eau distillée (tableau 02).

II.6.4.2. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité des plantes a été déterminé par la méthode suivante :

$$H\% = (\text{poids } \alpha - \text{poids } \beta) / \text{poids } \alpha * 100$$

Telle que:

α : poids de l'échantillon 'plante fraîche' ;

β : poids de l'échantillon 'plante sèche' ;

H%: le taux d'humidité en pourcent.

II.7. Tests microbiologiques

II.7.1. Introduction

Les bactéries sont des procaryotes à structure cellulaire très simples, sans noyau organisé ni de chloroplastes. Leur photosynthèse est anaérobique. L'énergie nécessaire à leur métabolisme est fournie par des réactions d'oxydo-réduction des substances organiques.

II.7.2. Les souches bactériennes testées

- **Escherichia Coli**

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est un bâtonnet à Gram négatif asporulé. Elle est aérobie ou anaérobie facultative. Sa température optimale de croissance avoisine les 35-37 °C, mais elle est aussi capable de croître à une température de 44,5 °C. Elle est capable de fermenter le lactose et possède les enzymes β -galactosidase et β -glucuronidase[99].

E. coli est un habitant normal de l'intestin des humains et des animaux à sang chaud. Cette bactérie joue un rôle utile dans l'intestin en participant, entre autres, à la synthèse de vitamines. Cependant, certaines souches particulières d'*E. Coli* présentent un pouvoir pathogène important[99].



Figure 44. Evaporation à sec.

Tableau 02. Concentration utilisées dans le test microbiologique.

Plantes stress	PVB (g)	PRB (g)	ΔP (g)	V (ml)	C (mg/ml)
Basilic					
Froid	7.6800	7.8269	0.1467	3	50
Eau saline	14.1993	14.4812	0.2819	5.638	50
Eau mazoutée	8.0324	9.8068	1.7744	35.48	50
Obscurité	7.6011	8.6968	1.0987	22	50
Etat normal	13.5656	13.6733	0.3077	6.158	50
Persil					
Froid	7.6179	7.8502	0.2323	4.64	50
Eau saline	7.1755	7.2975	0.122	2.44	50
Eau mazoutée	7.6459	8.8080	1.1621	23.24	50
Obscurité	7.6537	8.5412	0.8875	17.75	50
Etat normal	13.4937	13.6245	0.4588	9.17	50
thym					
Froid	7.6012	8.4055	0.8043	16.08	50
Eau saline	6.6171	7.8309	1.2138	24.27	50
Eau mazoutée	13.2897	13.7075	0.4178	8.352	50
Obscurité	7.1485	7.7790	0.6305	12.61	50
Etat normal	13.2272	13.9825	0.8155	16.31	50

Où :

PVB : poids vide de la boîte pétri.

PRB : poids remplis de la boîte pétri.

ΔP : la masse de la poudre.

V : le volume de l'eau distillée.

C : la concentration de la solution finale.

En raison de sa capacité de croître à la température de 44,5 °C, *E. coli* fait partie du groupe des coliformes thermotolérants (aussi appelés « coliformes fécaux »), qui est lui-même inclus dans le groupe des coliformes totaux. Cette bactérie est utilisée comme indicateur de contamination fécale. La présence d'*E. Coli* dans l'environnement indique de manière presque certaine une contamination fécale plus ou moins récente et la possibilité d'y trouver également d'autres microorganismes pathogènes tels des bactéries, des virus ou des parasites [100].

E. coli présente une meilleure spécificité en tant qu'indicateur de contamination fécale que les coliformes thermotolérants, puisque généralement, toutes les bactéries *E. coli* trouvées dans l'environnement ont une origine fécale, contrairement à certaines bactéries du groupe des coliformes thermotolérants, qui peuvent être de provenance environnementale ou industrielle. Par exemple, la bactérie *Klebsiella pneumoniae* est souvent présente en concentration élevée dans les effluents des usines de pâtes et papiers et elle donne un résultat positif avec les tests de coliformes thermotolérants. Dans ce cas cependant, *K. pneumoniae* n'est pas d'origine fécale [100].

- **Staphylococcus aureus**

Le microorganisme *Staphylococcus aureus* est une bactérie de la famille des Micrococcaceae de forme sphérique (coque), de 0,8 µm à 1,0 µm de diamètre. Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie non mobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase [99].

S. aureus est un microorganisme pathogène dont on connaît au moins deux types de manifestations cliniques chez l'homme. Les staphylocoques sont d'abord souvent mis en cause dans les cas de toxi-infections alimentaires où il y a production d'une entérotoxine thermorésistante responsable de gastro-entérites. Ils sont également responsables d'infections rhinopharyngées et cutanées qui sont de loin prédominantes par rapport aux infections gastrointestinales [99].

Les staphylocoques trouvés dans l'eau proviennent principalement de la peau, de la bouche, du nez et de la gorge des baigneurs et occasionnellement d'une pollution fécale. Les staphylocoques pathogènes (*S. aureus*) produisent plusieurs types d'enzymes qui participent à l'envahissement d'un hôte. Ces enzymes sont :

- La coagulase, qui protège la bactérie contre les mécanismes de défense de l'hôte;
- La leucocidine, qui attire et inhibe les leucocytes au site de l'infection (formation de pus);
- Les hémolysines, exotoxines qui détruisent les globules rouges;

- La phosphatase et la désoxyribonucléase (Dnase) dont les rôles demeurent ambigus dans le processus d'agression.

De plus, les staphylocoques sont parmi les organismes asporulés les plus difficiles à éliminer. En effet, ils résistent à une température de 60 °C pendant 30 minutes ou à 1 % de phénol pendant 15 minutes. Ils démontrent également une résistance au chlore et aux autres agents de désinfection utilisés dans l'entretien des piscines publiques[100].

II.7.3. Matériel

- Une gélose Mueller-Hinton en boîte de pétri ;
- Disques d'antibiotique ;
- Souches pures de bactéries à étudier ;
- Micropipette ;
- Tubes ;
- Eau physiologique stérile.

II.7.3. Activation des bactéries

Pour faire l'activation des bactéries on a pris une colonie d'un milieu solide vers un milieu liquide BN (bouillon nutritif), après 3heurs d'incubation on a fait l'ensemencement des tubes pour réaliser l'antibiogramme (incubation pendant 24h à 37°C).

II.7.4. Préparation de la gélose

- prendre la gélose de Mueller-Hinton, vérifier l'absence d'eau à la surface ; s'il y en a, laisser sécher;
- annoter où seront positionnés les disques d'antibiotiques sur le fond de la boîte (Il faut les éloigner de 1 cm du bord minimum);
- ensemencer la gélose par 1 mL de suspension;
- étaler le volume avec le râteau du centre vers les bords;
- laisser sécher de 3 à 5 minutes;
- déposer les disques d'antibiotiques;
- incuber 16 à 18 h, à 35 °C (au maximum 24 h).

II.7.4. Réalisation des antibiogrammes

Nous avons placés cinq pastilles (6mm) imbibées d'extrait de dose connues sur une souche bactérienne déposée dans une boîte de Pétri, et nous avons les placés à l'incubateur à 37°C. Au bout de 24 h, nous avons lit les différents diamètres d'inhibition (mm).

III.1. Résultats de l'étude bioinformatique

III.1.1. Les séquences trouvées dans la banque génomique NCBI

Les séquences nucléiques de gènes trouvés dans la banque génomique NCBI et qui sont responsable à la biosynthèse des tannins, sont représentées comme suit :

On commence par l'enzyme anthocyanidine synthase

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucgss&term=anthocyanidine+synthase+promotrice+region&report=docsum>)

1. Palgong-2_GS_5-end EST Populus tremula var. davidiana Palgong-2 PCR fragment for GS 5--end EST Populus tremula var. davidiana genomic clone Palgong-2, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ER973804.1>)

```
AACGATTCGTTTCGAGACCMTTTTGTAGCTTATCTCATTCTCTTGATAGATACCATGGCT
CCTGATATCACCCTACTCTCGCTAACAACGCCWCCACTCTTGTGAAGCAAGCTAGCTTG
TCGAGCTGTGCATATGTTACCTTTCTGGCTGGTGATGGAGACTACTGGAAGGGTGTTGTG
GGTTAGCCAAGGGTCTGAGGAAGGCCGAAAGTAAGTATCCACTTGTGGTGGCTATCTTG
CCTGATGTTCCCGAGGAGCATCGCAAGATTCTTGTTCCTCAAGGGTGCATAGTGAGGGAG
ATCGAGCCTGTTTCATCCACCGGAGAACCAGACTCAGTTTGCTATGCCTTACTATGTCATC
AACTACTCCAAGCTTCGTATCTGGGAGGTCTGTATGCATG
```

2. Taebaek-1_GS_5-end EST Populus tremula var. davidiana Taebaek-1 PCR fragment for GS 5--end EST Populus tremula var. davidiana genomic clone Taebaek-1, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ER973803.1>)

```
AACGATTCGTTTCGAGACCCTTTTTGTAGCTTATCTCATTCTCTTGATAGATACCATGGCT
CCTGATATCACCCTACTCTCGCTAACAACGCCCTCCACTCTTGTGAAGCAAGCTAGCTGT
CGAGCTGTGCATATGTTACCTTTCTGGCTGGTGATGGAGACTACTGGAAGGGTGTTGTTG
GGTTAGCCAAGGGGCTGAGGAAGGCCGACAGTAAGTATCCACTTGTGGTGGCTATCTTGC
CTGATGTTCCCGAGGAGCATYGCAAGATTCTTGTTCCTCAAGGTGCATAGTGAGGGAGAT
CGAGCCTGTTTCATCCACCGGAGAACCAGACTCAGTTTGCTATGCCTTACTATGTCATCAA
CTACTCCAAGCTTCGTATCTGGGAGGTCTGTATGCATG
```

3. Jungkuk-6_GS_5-end EST Populus tremula var. davidiana Jungkuk-6 PCR fragment for GS 5--end EST Populus tremula var. davidiana genomic clone Jungkuk-6, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ER973802.1>)

AACGATTCGTTTCGAGACCCTTTTGTAGCTTATCTCATTCTCTTGATAGATACCATGGCT
CCTGATATCACCCTACTCTCGCTAACAACGCCTCCACTCTTGTGAAGCAAGCTAGCTTG
TCGAGCTGTGCTATGTTACCTTTCTGGCTGGTGTGATGGAGACTACTGGAAGGGTGTGTTG
GGTTAGCCAAGGGGCTGAGGAAGGCCGACAGTAAGTATCCACTTGTGGTGGCTATCTTGC
CTGATGTTCCCGAGGAGCATCGCAAGATTCTTGTTCCTCAAGGGTGCATAGTGAGGGAGA
TCGAGCCTGTTTCATCCACCGGAGAACCAGACTCAGTTTGCTATGCCTTACTATGTCATCA
ACTACTCCAAGCTTCGTATCTGGGAGGTCTGTATGCATG

4. Undu-2_GS_5-end EST Populus tremula var. davidiana Undu-2 PCR fragment for GS 5--end EST Populus tremula var. davidiana genomic clone Undu-2, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ER973801.1>)

AACGATTCGTTTCGAGACCMTTTTGTAGCTTATCTCATTCTCTTGATAGATACCATGGCT
CCTGATATCACCCTACTCTCGCTAACAACGCCWCCACTCTTGTGAAGCAAGCTAGCTTG
TCGAGCTGTGCATATGTTACCTTTCTGGCTGGTGTGATGGAGACTACTGGAAGGGTGTGTK
GGGTTAGCCAAGGGTCTGAGGAAGGCCGAAAGTAAGTATCCACTTGTGGTGGCTATCTTG
CCTGATGTTCCCGAGGAGCATCGCAAGATTCTTGTTCCTCAAGGGTGCATAGTGAGGGAG
ATCGAGCCTGTTTCATCCACCGGAGAACCAGACTCAGTTTGCTATGCCTTACTATGTCATC
AACTACTCCAAGCTTCGTATCTGGGAGGTCTGTATGCATG

5. PaPtg_GS_5-end EST Populus alba x Populus tremula var. glandulosa PCR fragment for GS 5--end EST Populus alba x Populus tremula var. glandulosa genomic clone Populus alba x Populus tremula var. glandulosa, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ER973800.1>)

AACGATTCGTTTCGAGACCCTTTTGTAGCTTATCTCATTCTCTTGATAGATACCATGGCT
CCTGATATCACCCTACTCTCGCTACAACGCCACCCTCTTGTGAAGCAAGCTAGCTTGT
CGAGCTGTGCATATGTTACCTTTCTGGCTGGTGTGATGGAGACTACTGGAAGGGTGTGTKG
GGTTAGCCAAGGGKCTGAGGAAGGCCGAAAGTAAGTATCCACTTGTGGTGGCTATCTTGC
CTGATGTTCCCGAGGAGCATCGCAAGATTCTTGTTCCTCAAGGGTGCATAGTGAGGGAGA
TTGAGCCTGTTTCATCCACCGGAGAACCAGACTCAGTTTGCTATGCCTTACTATGTCATCA
ACTACTCCAAGCTTCGTATCTGGGAGGTCTGTATGCATG

6. Salix_GS_5-end EST Salix pseudolasiogyne PCR fragment for GS 5--end EST Salix pseudolasiogyne genomic clone Salix pseudolasiogyne, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ER973799.1>)

AACGATTCGTTTCGAGACCCTTTTGTAGCTTATCTCATTCTCTTGATAGATACCATGGCT
CCTGATATCACCCTACTCTCGCTAACAACGCCTCCACTCTTGTGAAGCAAGCTAGCTTG

TCGAGCTGTGCATATGTTACCTTTCTGGCTGGTGATGGAGACTACTGGAAGGGTGTGT
GGGTTAGCCAAGGGGCTGAGGAAGGCCGAAAGTAAGTATCCACTTGTGTGGCTATCTTGC
CTGATGTTCCCGAGGAGCATCGCAAGATTCTTGTTCCTCCCAAGGGTGCATAGTGAGGGAGA
TCGAGCCTGTTTCATCCACCGGAGAACCAGACTCAGTTTGCTATGCCTTACTATGTCATCA
ACTACTCCAAGCTTCGTATCTGGGAGGTCTGTATGCATG

7. *Agrobacterium tumefaciens* DNA, clone: LM5, Sp6 end, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AB072687.1>)

TTGCCGTGGCGGGTGTGATGCCGGTCTTGCCGCCGACGGAAGAATCGACCTGCGCCAGC
AGCGAGGTCGGTATCTGCACGAAGCGCACACCGCGGCGCACGATGCCCGCAGCAAACCG
GCGAAATCGCCGATAACGCCGCCGCCGAGTGCATCACCGCATCGTTACGCNCCACTCTT
GCTGCC **AAAACCGCAT** CGCAGACGGTGACCAGATGCTCGAAGCTCTTGGTCTTTNCGCCA
GCCGGCGGGGTGAGCGAA

8. *Agrobacterium tumefaciens* DNA, clone: LL13, Sp6 end, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AB072649.1>)

TTGCCATTGGGGTTGATCAGTTTCGCTGCGGCAGAACATGGTTTTTCAGTTTCAAAAACGG
TGGAGTGACAGTGCAACAGGAGTTCCTCCCGGTTCCGGATAGGGTTTTCCGGCGCCCGCC
ATGGCGGGGAGGTCGGGCTTGCGGCCGATCTGTGCATAGTCCGGAATATGAAGTTCAGAC
GTGTCGAACAATGC **AAAACGCGG** GGTCTGTGCTGGCGGGCGCGCCCGGCGCACAGGCCTGA
TCGTGCGCGGTATCAGCACCCTTGATGGTTACCTTGTGGGCCCCGGCTTGAAATGA
CGCATCGTCACATTGATCGGCAGATGCCGAAAATGCCGCCGCAATTGTTGGAAATCGGC
ACGGTCGAGGCGATCTCGTCATTGACGTAGATATCGATATGGCTGCCCGGCAGTACCTGC
GACGAATAGGCGGCGTCGAGCAGAAGCGACGCCTCGCCATAGCCGAGGCATAAAAATCGG
CGGGCATGCCACGTTAAACTCTTTGCGGAAACGCCGGCCGCAAATTCGGTGCTTTCCA
GGCCAAGTTCGG **AAAGCGCGA** TACGGCGGTCCGACATCACAAGCGGCACATCGGGCGCAT
GCCACCTGCGGGTTGAAAAGGTCGTTCTCTGAGCGCCGGGCGTTTCGCGATATCGAGGAAA
AAAGCGTCTCTATTGCCGCTGAACCGCTGCGGGGTGGGGCCACTGACGAAAAGCGGCG
AAAGACCACAGGTGCTGCGGCGCAAAGCCGGCAAAGGCGCCCGCCGACGCCTCGGGCGG
CAGCGTACCGACTATCCCGCAATCTCACGGGCGGTTCCGACGAGGACCGTCAGCGTGCC
TGCTTGCGTTCGTGGAAGGCGCGGCCACGAAACGGATCGCCTGGTTCGGCATCTGGGT
TCTGAGCGCCAGCGCTGTGAAAGACGCAGGAAAGAATCCGCAAACGCCGATTGCCGAG
TGCCGGCGGACAATCTCGATCGACGTCATCGCCTTGCCGTCCGGCCCCGTTGCCTGAAT
ATCGTCGATATTGGCAAAGCTTCTGCGACATCGGCATTAAGCCGATATAGGTGCTCGC
AGGGTCGACATCGGTCCACAGATCATAGGTGGACTGGATCGTGCAATCGGTTCTGTGGCG
TTGCTGCACGCCAGTCTCACGACATTTGAGCCGACCTGCAGGACGCCGGGCGGAATCTT
CAAGGAGACATTGCCCTCGCTGTGCGGCGCTTCAATACGCGCCGGCTCCAGCGGGACATT
GTTACAGGCTGACCTGA **AAATTCGAGCTTTCCGGCGCGA** ACCACGATGGCGTTCTGATAGCC
GATATTGAGCGAAACGGCGGCATTCACCTGCTCCGGCGTCAGATAGATGCTCCATTGCCG

GCGGTTCGATCTCACCAGAAAGGCTGAGCTTTTCATAGGGCAGGATATATCGGGCGCGGCT
GTCGGCGCTGAGCGGCGAGGCCTGCGCCGGAACCGGCCTTGCGCCTTC

9. Agrobacterium tumefaciens DNA, clone: 2J24, T7 end, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AB072626.1>)

AAGCTTGACGTGAATGCTGCGGATGCTCCAACACCTCAATTGCCTATTGCCCCACATAGC
GGGCGCGGGTTCGGATGAGTTTGTTCATCCGATTTCTGTTCCAGGGCATGAGCTATCCAGC
CGGCAGTCCGTGCGACGGCGA **AAAGCACCAGGGCCGAGCCGCGC**GGCAGCCCTAGACTGC
GTCGCAGGCTCACCAGTGCTACATCGCAGTTCCGGCAACTGACCGGTAGTATCGTTCATCA
CCTGCAGAAGCTCATCTCGCTGCGCGTCCGGCGGGAA

10. 999-r1a Williams 82 BAC Gm_ISb001_056_G02 EcoRI subclone library Glycine max genomic clone 999 similar to chalcone synthase, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AZ313412.1>)

TGAAGTGACGGAGATAGCTTTGGGTTTGGAGAAATCGGAGCTTCCTTTTTTGTGGGTGTT
GAGGGTTCATCGCGTCCCGTGTGACCCATATGTGCTGCGTTTGCCGTAAGGGTTCGAGGA
GCGAACGAAGGCCCGTGGAGTTGTGTGCAGGAGTTGTTGCCTCTTTGAAGATATTGGAA
CACGTGACTGTTGGAGGGTCTTGACTCACTCCGGCTGGACATCTGTGGTGGAGGTTATT
CAGAACGAGAAACCGTTGATTCTGTTGACGTTCTTGGCAGATCAAGGGAT **AAATGCGCGA**
GTGTT

La séquence correspond à l'anthocyanidine réductase

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?db=nucgss&term=anthocyanidine+reductase&report>)

11. Schizosaccharomyces pombe genomic clone harboring house keeping gene, clone 82-3E, sequenced with M13M4 primer, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AU036670.1>)

CAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGATCACATAAAAGTATTACTCATCCATGTGCTTCATAA
ATGTACGCTTGTGATGTTGAACACCTAAGGTACCAAGTTCGTCAATGTCAGCCTTGTCTA
GAGTGAAAGAATCAAAATTCAAGCACTCCTTCATACGCTCAATTTTTGAGGTAGTAGTGA
TAGGTATAACGCCTTTAGAAATAGGCCCACTTGAGAAGAATTTGAGTATCAGAAACATGGT
ACTTGCTCTCCAATGATTTAGTGAATTCAGCAACAGGACCTTGCGCATCACGAACCAAGG
GAGAAAGAGGGCCATAACCCCTCAACGATAATTCCTTTACTCTGGCA **AAATTCTACAAGAG**
GCTTCGCGGCCCTTGATATACTTGAGGGTGAATTCGATTTGGTTGACACGAGGAGTAATAG
TTGAAGTTTTCAACAGCTCCTCTAAGTCGGGAATACGAAAGTTAGAAACACCAACTGAGT
GGACAAGACCGGTTCCCAAAGCCGTTTCCATTGCTTTCCAACCTTCAGAAATGGGTATTT

TCTTTTCTAGAAAGGAATAGGACTATGGCAA

12. *Schizosaccharomyces pombe* genomic clone harboring house keeping gene, clone 65-5E, sequenced with M13RV primer, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AU036657.1>)

GAGTCGATCTTTAATCAACCCTTTCCATCCAACAGTTGTACGAGGCTTTTCAAGATAGGC
GCGCATAATAATATGCAAGTCCTTCTTGTGCTTAATAGCCTCCTTTTGCNNTCGAATGGC
ATACTCCTTGGCGGCAACAGGATCGTGTAAGAACAGGGTCCAACGATTAGAAGAAGTCT
ATCATCACGTCCCGCAATGATATCGGCGGCTTGGCGTCTTTGATCCGACACAAAAGCAAG
TGTTTCATCAGAGGCTGCTAATTCTGATTGAATTAAGCAGGTGAAATTACTGGATCATA
GCCTTTGATACGACTATCTTCAGTTTTACAACGTGAAANAAACACTGTCGCCAGGAAGAA
GAGGAGTGTGCTCGTCCATCTCTTAATGATTTCTAACTTGTAGAA

13. *Schizosaccharomyces pombe* genomic clone harboring house keeping gene, clone 60-4D, sequenced with M13RV primer, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AU036648.1>)

CCTCTAGAGTCGATCAGATAATTCTTCATTTTAAAGTTCCAAAGACTCCTCTCTTAGATG
CTGCACAACGTCAGTCAGATATTCTGTATGCCAGCCAGACTTGGCTGATGTCTCTGACTA
AGTTTTTGGAAATCTATATAAATAGCGATATACGGCCCTTTCTCGCCTCTTTTCCCTAAA
CAGAGCATTTTTAAAGAAGAATTATAATTCTGCTGCGATCTCTTTTCTTTGCTGCAAAAT
CTCGGTTAAGTTATCATTATTCTTTTACATTTTATCCGCACTTTAAGTACGCTCTTGTGC
TACCTTTTCTCTTTTCAGTCTTCGTACTCTAACATTTCAACATGCTTATCGCGCTAGGGCC
TAAGATCCGTCCTGCTTATGGGGTGGTCAGCTTGTTAAGAAGAAAGGGAAAATCATCGAA
CATGTAATCGGTAAGAAGCCTGCTGCTGGGTTCT

14. *Schizosaccharomyces pombe* genomic clone harboring house keeping gene, clone 60-4D, sequenced with M13M4 primer, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AU036647.1>)

CATGCCTGCAGGTCGATCCCGTCGTGTTGTGGTTGAACGGTGGTCCTGGTTGCNCTTCCC
TTACTGGTTTGTTCATGGAATTAGGTCTTCTTCAATCAACATTGAGACTCTTAAACCCG
AATATAACCCTCACAGTTGGAACCTCAATGCTTCAGTTATCTTTTTGGATCAACCTATCA
ACACGGGTTTCAGCAACGGAGATGACTCGGTTCTTGACACTGTTACGGCTGGTAAGGATG
TTTATGCATTCTTGAACCTTTTCTTTGCCAAGTCCCTCAGTACGCTCATTGGACTTTC
ACATTGCTGGTGAATCCTATGCTGGCCATTACATCCCCCAGTTTGCCAAG

15. *Oryza sativa Japonica Group* DNA, clone: H0525_5_202_1A, 3' flanking sequence of Tos17 insertion in rice strain H0525, genomic survey sequence

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/AG021006.1>)

```
CTTCTGTTCTTTTGGATCCATTATGATGCTTATGTTGCCCGTCATTTGGTTTGAATTCA
TATTTGATGATCTGATATTTGTTTAGCTTTATTGGCTTTGTTGGAGTTCTTGAAATTTTC
TTATATCAATGCTGCTTTTTTGC GTTGTTC AATTTCTTGTGTGGATATATTTCTTCAGGT
GCTTCAATTTTTTATTATATGTATATTGTGCCAATGTGACTTGATAATTTCTATATGATG
CACCATTT CAGAATACCACCCGCTTGGACAGTGAGATAATTTATGACAGAGATTTTGACT
ATGACTACTTTGGTTTTAAGACCCTTGAGAGATCTTATCTGTTAAAAGTTGTTGGGAAGG
TTGTGGAAAGACCACAGCATATGCTAATGAGAGTTTCTATTGGGATACACAAGGATGATA
TTGAATCTGCTATCAAAACGTACCACATGATGTCTCAGCGCTGGTTTACTCATGCTTCGN
CAACCCTTTTCAATGCTGGCACTCCAAGGCCTCAAGTAATATGCTTCCTACCATTGAAGT
CCAATTTGGATTATTA AAAATGGTCTCTTATGCTCCTCT
```

III.1.2. Les séquences trouvées dans la banque génomique EMBL

Les séquences nucléiques de gènes trouvés dans la banque génomique EMBL et qui sont responsable à la biosynthèse des tannins, sont représentées comme suit :

Les séquences trouvées pour l'enzyme anthocyanidine

1. >embl|AF492635|AF492635 Capsicum annuum putative anthocyanidine rhamnosyl-transferase (upa11) mRNA, complete cds. ...

([http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:AF492635\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:AF492635]+-newId))

```
TTAAAAACTTCCATAGCACACAAAAATGGCAGAAAATGGCAAAAAGTTGCATATTGCAGT
ATTTCCATGGCTAGCTTTTGGGCATATGATTCCATATTTAGAGCTATCAAAGCTCATTGC
TCGAAAGGGTCATACAGTTTCTTCAATTTCTACTCCTAGAAACATCGATCGTCTACCAA
ACTTCTCCAAATCTTTCTCAGTTCTTGAAGTTTCGTCAAACCTCCGATGCCCCACGTGGA
AAAGTTACCGGAGAATGCAGAAGCCACTATTGATGTACCTTTTGAACAAGTCAAGTACCT
TAAACTTGCTCAAGATGGACTTGAAGAATCAATGGCTAAGTTTCTCGAAGATTCAGCTCC
TGATTTTATATTCTTTGATTTTACTTCTTATTGGGTTTCTTTCAGTTGCTTCAAAAATCAA
CATTCCAACGGCTTATTT CAGCATATTCATCGCCGCGTTTTCTGGGTTTCGCCGGACCTGT
GCCGGGATTGAACAATGATTATGAAATTCGGAAGACGCCAGAGGAATATACTGTTCCACC
GAAATGGGTGTCGTTT GAGACCACTGTTGCATGGAAGCTGTTTGAAGTTTCTCGAATCTT
CGAGGCATCCATGGAGGGTGATGAAGAGAACATTGCTGATATTACTCGTTTCTATAAATC
TGTGGAAAATTGTGATTTTTTTCTTGTGAGGAGTTGTTCTGAATTCGAACCAGAATGGTT
GAAAGTTATTCAAGATATTCACCGGAAACCAGTTTTTCCGGTGGGTCAACTTCCGACAAC
GACATATGAAGATGAAACCACGAAGATCAATGCATGGAGAGAGATAAAAATTTGGCTCGA
```

TAAGCAAGAAAAGGGAAGAGTGATCTATGTAGCGTTTGGTAGCGAGGCAAAAACCGAGTCA
AAATGAACTCACTGAGTTATCACTCGGGTTAGAACTTTCCGGATTACCATTTTTCTGGGT
TTTGAGAATAAAAGAGGGGAATCTGATGATGAATTGATTTGCTTACCAGAAGGGTTCGA
GGAACGAAACAAAAGGGAAGGGGAATTGTGTGCACGAGTTGGGCGCCGAGCTCAAGATACT
GAGTCATGATTCAATAGGTGGATTTTTGACTCATTCTGGATGGAGTTCGGTGGTTGAAGC
AATACAATTTGAAAAGCCATTGGTTCATTAACATTCTTGGCTGATCAAGGAATAAATGC
TAGGCTTTTGGAGGAGAAGAAGATGGCGTACTCGATAACCGAGAAATGATCGGGATGGATC
ATTCACTCGTGACTCGGTGGCTGAGTCGGTAAGTATGGTACTCGTTAAGGAAGAGGGTGA
GATTTATAGAAAAGAAGGTTAAAGAGGTGAAATATCTTTTTTGCACAAAGAAAAGACAAGA
CAATTACGTGAAAAATTTATTAAGTTATCTTCAAAATTATAAGAAAACCTAGAACATAAAA
TGAGTCGATTTGCTTGCATTTTTCAATAATTGTGATTTTCAGATCAATTTATGTACCCCTT
AGATTATTTTATCGGATTATCAATTATCTCCATGAGTAAGCGATAGTTCTTTTTTCTTTA
AAA

2.>embl|GT000337|GT000337 TransId-212816 CACATN1 Coffea arabica cDNA clone CACATN1-3Y89TV
similar to Putative anthocyanidine rhamnosyl-transferase - Capsicum annuum (Bell pepper), mRNA sequence.

...

([http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:GT000337\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:GT000337]+-newId))

CGGCCGGGGGATTCCACATTTTGTACAGACTGCTAATTTCACTGCAGGCTTAGACTATAA
AAACACCACCAGAAATCAAAGACATTTTCAGCCACGAATCAGAGTTGAGACAACTTGACAT
CCATGGCTGAAGACGGCAAATTACACATAGTAATGTTTCCTTGGCTGGCCTTCGGCCACA
TGATCCCATACTTAGAGCTCTCCAAGCTCATAGCTAAAAGGGGTCACAAGGTTTCCTTCC
TTTCCACCCCAAGAAACATCGATCGCCTCCCAAAACCACCTCCAAATCTAACCCGTCATC
TGAAATTTGTCAAATTCCTTACCCCATATCGAAAATCTCCCTGAAAATGCAGAGGCCA
CTACTGATCTACCCTACAACAAAGTCAAGTACCTCAAACCTAGCCTGTGACGGCCTTCAAC
AACCCATATCTGAATTTCTTCAACAACTTGTCTCCTGATTGGGTCTCTTCGATTTTCGCTC
CTTATTGGATAACCATCTGTTGCATCTAAGCTGAACATCCGTACAGCTTTTTTCAGTATCT
ATACTGCGCCATTTTTGGGCTTTTGGCGCCCCGTCGAAGTGATGAAGGGCAATGGAGAAG
ACAGGAAAACGCCCCAGGATTTCACTGTGAAACCCAAATGGGTTTCTTTTGAGACGAACA
TTGCTTTTAAGTTGTTTGAGATTT**CGCG**ACTCGTTGACAGTTTGATCGGGGATGAAGAGC
CCATCTCCGACATATTCCGGGGCGGATCTTCGATTGAAAACCTGCGATTTCTTGGCTATAA
GGAGCTGTTCTGAGTTTCAACCCGAATGGTTACAGCTTATGGAGGAGATTTATCAGAAGC
CGGTGATTCCGGTTCGGGTCCTGCGGACCACCGGCAACAATGATGCGGATGAGGGAAA

3.>embl|GT008922|GT008922 TransId-239182 CAET42MIX Coffea arabica cDNA clone CAET42MIX-CFEYF44TV similar to Putative anthocyanidine rhamnosyl-transferase - Capsicum annuum (Bell pepper), mRNA sequence. ...

([http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:GT008922\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:GT008922]+-newId))

```
CGGCCGGGGGATTCCACATTTTGTACAGACTGCTAATTTCACTGCAGGCTTAGACTATAA
AAACACCACCAGAAATCAAAGACATTTTCAGCCACGAATCAGAGTTGAGACAACCTTGACAT
CCATGGCTGAAGACGGCAAATTACACATAGTAATGTTTCCTTGGCTGGCCTTCGGCCACA
TGATCCCATACTTAGAGCTCTCCAAGCTCATAGCTAAAAGGGGTCACAAGGTTTCCTTCC
TTTCCACCCCAAGAAACATCGATCGCCTCCCAAAACCACCTCCAAATCTAACCCGTCATC
TGAAATTTGTCAAATTCCTTACCCCATATCGAAAATCTCCCTGAAAATGCAGAGGCCA
CTACTGATCTACCCTACAACAAAGTCAAGTACCTCAAACCTAGCCTGTGACGGCCTTCAAC
AACCCATATCTGAATTTCTTCAACAAATTTGTCTGATTGGGTCTCTTCGATTTTCGCTC
CTTATTGGATACCATCTGTTGCATCTAAGCTGAACATCCGTACAGCTTTTTTTCAGTATCT
ATACTGCGCCATTTTTGGGCTTTTTCGGCCCCGTCGAAGTGATGAAGGGCAATGGAGAAG
ACAGGAAAACGCCCCAGGATTTCACTGTGAAACCCAAATGGGTTTCTTTTGAGACGAACA
TTGCTTTTAAGTTGTTTGAGATTTCGCGACTCGTTGACAGTTTGATCGGGGATGAAGAGC
CCATCTCCGACATATTCCGGGGCGGATCTTCGATTGAAAACCTGCGATTTCTTGGCTATAA
GGAGCTGTTCTGAGTTTGAACCCGAATGGTACAGCTTATGGAG
```

4.>embl|CA914524|CA914524 PCSC08301 Scarlet Runner Bean Suspensor Region TriplEx2 Phaseolus coccineus cDNA 5' similar to Putative anthocyanidine rhamnosyl-transferase, mRNA sequence. ...

([http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[EMBL:CA914524\]+-newId](http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[EMBL:CA914524]+-newId))

```
TGAAGTGACGGAGATAGCTTTGGGTTTGGAGAAATCGGAGCTTCCTTTTTTGTGGGTGTT
GAGGGTTCATCGCGTCCCGTGTGACCCATATGTGCTGCGTTTGCCGTAAGGGTTCGAGGA
GCGAACGAAGGCCCGTGGAGTTGTGTGCAGGAGTTGTTGCCTCTTTGAAGATATTGGAA
CACGTGACTGTTGGAGGGTCTTACTCACTCCGGCTGGACATCTGTGGTGGAGGTATT
CAGAACGAGAAACCGTTGATTTCTGTTGACGTTCTTGGCAGATCAAGGGATAAATCGCGCA
GTGTT
```

III.1.3. Résultats d'alignement

Pour faire l'alignement de toutes les séquences nucléiques trouvées dans les banques génomiques (NCBI et EMBL) on a utilisé un logiciel d'alignement NCBI BLAST ou EMBL BLAST.

On a localisé la boîte CGCG et on a copié les séquences trouvées dans les deux banques génomiques dans la région promotrice de l'enzyme anthocyanidine (ans), on trouvé quelques gènes qui renferment le motif

On a trois gènes de l'enzyme anthocyanidine (1-EMBL), (2-EMBL) et un seul gène de l'anthocyanidine réductase (12-NCBI) ont marqué uniquement la présence de la boîte CGCG (figure 44).

Malgré qu'on a été dans la région promotrice mais on a trouvé neuf gènes qui n'ont pas ni le motif ni la boîte CGCG (figure 44).

On a aussi dans un seul gène de l'anthocyanidine (8-NCBI) trois répétitions de motif étudié (figure 44).

Pour l'enzyme anthocyanidine synthase (ans) (7-NCBI) on a trouvé que la guanine soulignée de la CGCG-box a été remplacée par l'adénine (CGCA) (figure 44).

Ans. Clone: LL13 (rp) (8-NCBI)	CAATGC AAA	ACGCGG
Ans. Clone: LL13 (rp) (8-NCBI)	GCCAAGTTCGG AAA	GCGCGA
Ans. Clone: LL13 (rp) (8-NCBI)	TGCGACGGCGA AAAGCACCAGGGCCG	CCGCGC
Ans. Clone: 2J24 (rp) (9-NCBI)	GATCAAGGGAT AAAT	GCGCGA
Ans. Clone 999(rp)(10-NCBI)	TTTACTCTGGCA AAATTCTACAAGCT	TCGCGG
Anr. Clone 82-3E (rp) (11-NCBI)	TACTCTGGCA AAATTCTACAAGAGGCT	TCGCGG
Anr. Clone 60-4D (rp) (12-NCBI)	CGTACTCTAACATTTCAACATGCTTA	TCGCGC
An rha-tran (upa11) (rp) (1-EMBL)	ACGGCTTATTTCAAGCATATTCATCG	CCGCGT
An rha-tran – Cap.an (rp) (2-EMBL)	AACATTGCTTTTAAGTTGTTTGAGATT	TCGCGA
<u>An.P.c.c</u> 5'(rp) (4-EMBL)	AGATCAAGGGATAAAAT	GCGCGA
Ans.clone: LM5 (rp) (7-NCBI)	GCTGCCA AAA	CCGCAT

AAA (C) X_n (A/C/G) CGCG (C/G/T)

Figure 44. Alignement d'acide nucléique de quelques séquences contenant le CGCG-box. Ans : anthocyanidine synthase ; rp : région promotrice ; anr : anthocyanidine réductase ; An rha-tran : anthocyanidine rhamnosyl-transferase ; An rha-tran – Cap.an : anthocyanidine rhamnosyl-transferase - Capsicum annum ; An.P.c.c 5' : anthocyanidine Phaseolus coccineus cDNA 5'.

II.2. Le taux d'humidité

Le Taux d'humidité correspond à la quantité d'eau perdue par la plante lorsqu'elle subit un stress. Il s'exprime généralement en pourcentage.

D'après les trois espèces choisies et les résultats obtenus (tableau3) on a remarqué que le Taux d'humidité dans le basilic est élevé que celle dans le persil et le thym ceci dans l'état normal, mais si on fait une comparaison entre les espèces stressé et non stressé on constate que le taux d'humidité est important dans les espèces stressé par rapport à celle non stressé (état normal).

Les espèces qui ont subit un stress d'eau saline (le basilic) et d'eau mazoutée (le persil et le thym) ont un taux d'humidité assez important que celle les autre stress.

D'après **Taleb et al (2004)**, les éléments sensibles à la déshydratation DRE pourraient être directement, ou en cascade par CAMTA. En d'autres termes le stress peut induire une perte d'eau chez les plantes.

Tableau 3: les teneurs en humidité des trois espèces de plantes exposées et non (état normal) aux différent stress.

Basilic	α (g)	β (g)	H%
Froid	1.4091	0.6032	57.19
Eau saline	6.6448	0.5543	91.65
Eau mazoutée	17.1874	2.718	84.18
Obscurité	9.4875	0.8868	90.65
Etat normal	14.0174	1.3175	90.60
Persil			
Froid	1.2058	1.0637	11.78
Eau saline	5.1185	0.6628	87.05
Eau mazoutée	4.9077	0.6060	87.65
Obscurité	4.6652	0.7560	83.79
Etat normal	13.3026	1.6755	87.40
thym			
Froid	1.1259	1.0637	5.52
Eau saline	6.3502	1.7670	72.17
Eau mazoutée	9.1240	1.2427	86.37
Obscurité	11.0303	1.9216	82.57
Etat normal	12.3953	2.6752	78.41

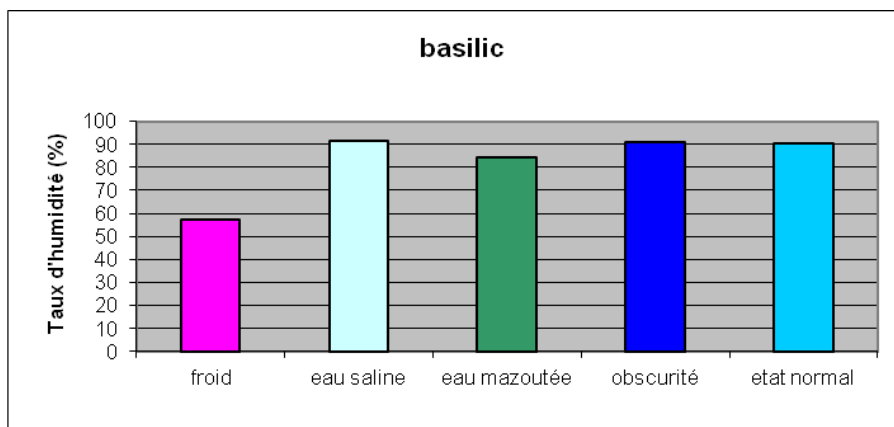


Figure 45. Histogramme de teneur en humidité des trois espèces exposées ou non aux différents stress.

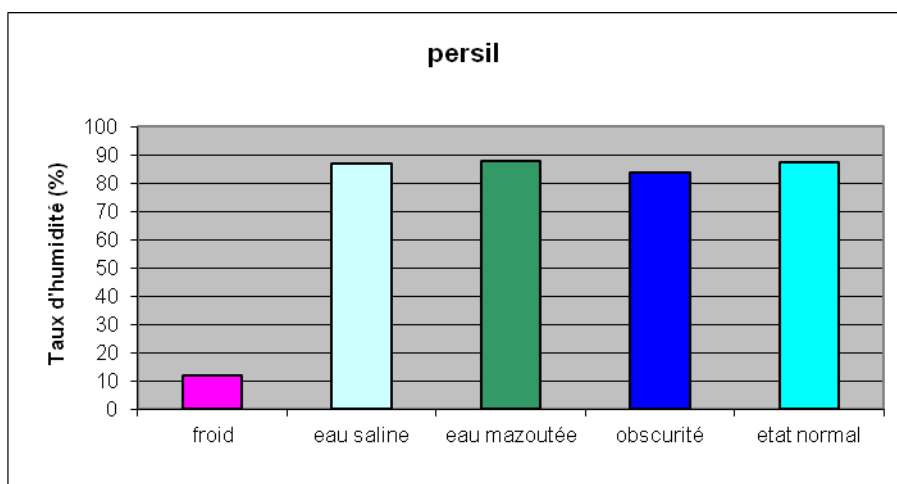


Figure 46. Histogramme de teneur en humidité des trois espèces exposées ou non aux différents stress.

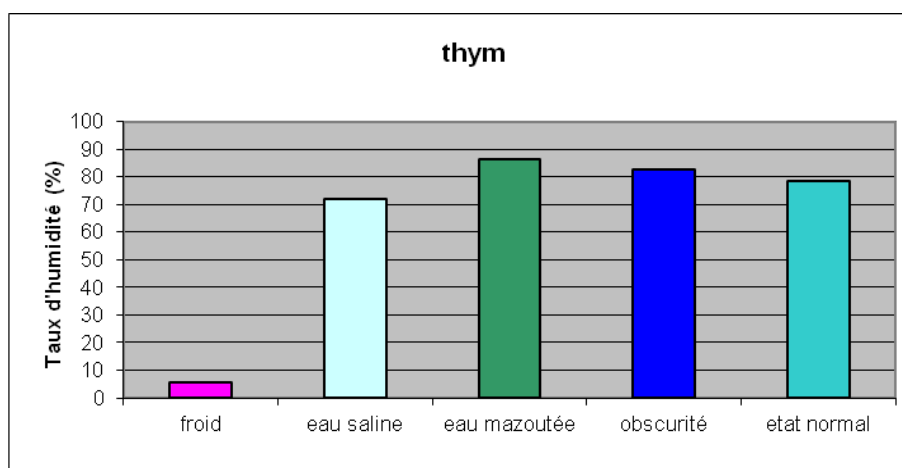


Figure 47. Histogramme de teneur en humidité des trois espèces exposées ou non aux différents stress.

III.3. Résultats du test du pouvoir antibactérien

Pour le pouvoir antibactérien on a fait une comparaison entre l'effet des trois espèces stressée et non stressée sur deux souches bactériennes E.coli et S.aureus par réalisation d'un antibiogramme.

On a déposé les disques imbibé par les extraits (10 μ l) à la surface de la gélose, et après 24h d'incubation on a mesuré le diamètre de la zone d'inhibitions des différentes souches avec les différents extraits (tableau 4).

Les zones d'inhibition mesurée de chaque extrait stressée est importante par rapport à celle non stressée.

Tableau 3: les teneurs en humidité des trois espèces de plantes exposées et non (état normal) aux différent stress.

Basilic	E.coli	S.aureus
Froid	7	12
Eau saline	7	8
Eau mazoutée	10	13
Obscurité	0	0
Etat normal	0	0
Persil		
Froid	0	0
Eau saline	15	11
Eau mazoutée	19	0
Obscurité	0	7
Etat normal	0	0
thym		
Froid	0	7
Eau saline	0	0
Eau mazoutée	11	0
Obscurité	10	7
Etat normal	0	0

III.3.1. L'effet de l'extrait de basilic sur E.coli et S.aureus

Le test d'antibiogramme avec l'extrait de basilic stressé sur les deux souches a montré qu'il n'y a pas une grande différence de l'activité antibactérienne obtenue avec les deux souches (E.coli et S.aureus) par rapport à celle non stressé. Par contre dans l'extrait de basilic stressé par l'obscurité on n'a pas remarqué une d'inhibition pour les deux souches bactériennes (figure 48.49).

III.3.2 L'effet de l'extrait de persil sur E.coli et S.aureus

Pour les résultats obtenus avec le persil on a remarqué qu'il ya une bonne réponse avec E .coli par rapport au S.aureus pour les extrait stressée par eau saline et eau mazoutée, par contre le persil stressé par l'obscurité a donné des résultats négatif avec E .coli (0mm) par rapport au S. aureus (7mm), pour le stress de froid on n'a pas obtenu des zones d'inhibition pour les deux souches bactériennes (figure 50.51).

III.3.3. L'effet de l'extrait du thym sur E.coli et S.aureus

L'extrait du thym stressé par l'eau mazoutée et l'obscurité a donné des zones d'inhibition remarquable (11 et 10mm respectivement) par rapport aux extrait stressé par froid et eau saline et celle non stressé (état normal) ceci avec E.coli (figure 52), mais concernant S.aureus on a une activité antibactérienne faible pour les extrait stressé par le froid et par l'obscurité, mais pour les stress de froid et l'eau saline ainsi que l'état normal on n'a pas remarqué une activité antibactérienne (figure 53).



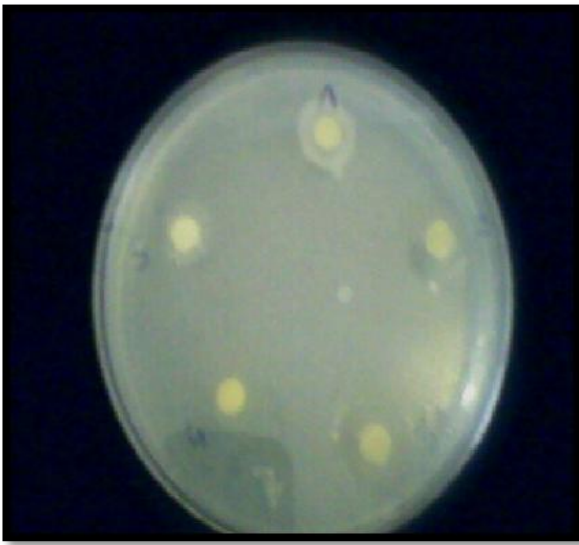
1. froid
2. eau saline
3. eau mazouté
4. obscurité
5. témoins

Figure 48. Effet des extraits (basilic) sur E.coli.



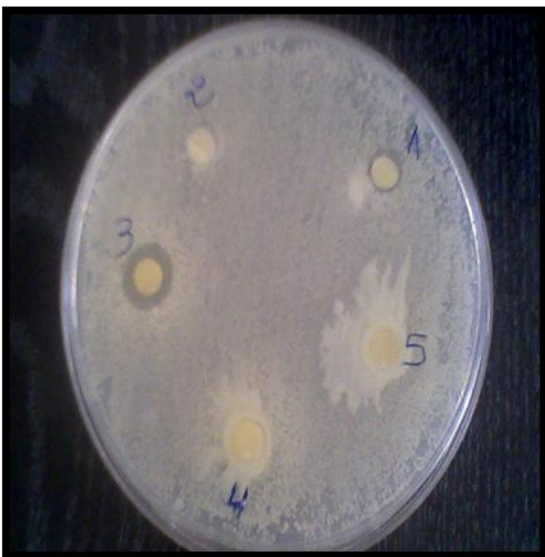
1. froid
2. eau saline
3. eau mazouté
4. obscurité
5. témoins

Figure 49. Effet des extraits (basilic) sur S.aureus.



- 1. froid
- 2. eau saline
- 3. eau mazouté
- 4. obscurité
- 5. témoins

Figure 50. Effet des extraits (persil) sur E.coli.



- 1. froid
- 2. eau saline
- 3. eau mazouté
- 4. obscurité
- 5. témoins

Figure 51. Effet des extraits (persil) sur S.aureus.



- 1. froid
- 2. eau saline
- 3. eau mazouté
- 4. obscurité
- 5. témoins

Figure 52. Effet des extraits (thym) sur E.coli.



- 1. froid
- 2. eau saline
- 3. eau mazouté
- 4. obscurité
- 5. témoins

Figure 53. Effet des extraits (thym) sur S.aureus.

Conclusion

L'objectif de notre travail est basé sur l'étude bioinformatique pour identifier le motif AAA (C) X_n (A/C/G) CGCG (C/G/T) dans les régions promotrices des gènes responsables à la biosynthèse des tanins, et une étude microbiologique des extraits des trois espèces de plantes (basilic, thym et le persil) stressées ou non par quatre genres de stress.

La recherche du motif étudié a été trouvée dans les promoteurs des gènes anthocyanidine synthase ((8NCBI), (9NCBI), et (10NCBI)), ainsi que dans le promoteur du gène de l'anthocyanidine réductase ((11NCBI)) et dans le promoteur du gène de l'anthocyanidine *Phaseolus coccineus* cDNA 5' ((4EMBL)). Nous pouvons dire que l'anthocyanidine est le précurseur de la biosynthèse des tanins, donc pour répondre aux différents stress, les plantes doivent donc percevoir le stress, transmettre le signal au noyau et activer l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes d'adaptation. Le calcium est connu pour servir de messenger secondaire à la médiation d'un stress.

Nous avons remarqués que lorsque la plante subit un stress, il y a une perte importante d'eau au niveau des cellules nous avons démontrés ça par le calcul du taux d'humidité, nous avons trouvés que le taux d'humidité des plantes non stressées est plus important que celle stressées.

Nous avons exposés trois espèces de plantes (le basilic, le thym, et le persil) à quatre genres de stress (le froid, l'obscurité, eau saline, et eau mazoutée), et nous avons préparés des décoctions à partir des extraits de ces plantes. Nous avons fait des tests microbiologiques par réalisation des antibiogrammes avec deux souches bactériennes différentes (*E.coli* et *S.aureus*). Les résultats obtenus montrent que les diamètres des zones d'inhibition des extraits de basilic stressée avec *S.aureus* est plus important que celle avec *E.coli*. Pour les extraits de persil nous avons remarqués le contraire c-à-d les zones d'inhibition obtenue avec *E.coli* sont plus important que celle *S.aureus*. Même observation pour les extraits du thym. Concernant les extraits des non stressés nous n'avons pas remarqués les zones d'inhibition pour les trois espèces des plantes (basilic, persil, et le thym).

Nous pouvons dire que les plantes qui sont subit un stress ont un effet bactéricide remarquable par rapport aux celle qui sont à l'état normal, donc nous pouvons conclure que lors d'un stress il y aura une sécrétion des composés polyphénoliques par des réactions enzymatiques. Ces composés augmentent l'effet thérapeutique chez les plantes médicinales.

Il n'y a pas que le test microbiologique qui fait le dosage des tanins mais il y a plusieurs méthodes telles que la spectrophotométrie à UV visible, la méthode colorimétrique de Folin Denis, et d'autres méthodes qui sont utilisées pour compléter et confirmer le test microbiologique.

Références bibliographiques

- [1] Wichtl, M. et Anton, R. (2003). *Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, 2^e éd. (trad. française de Teedrogen und Phytopharma, par Anton, R. et Bernard, M., XCVI - 692 p., Tec & Doc - Éditions médicales internationales.
- [2] C. Parent et al., *C. R. Biologies* 331 (2008).
- [3] T. Simonneau, Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux, UMR Agro-M/CNRS/INRA/UM 2, Montpellier.
- [4] (Reddy, 2001; Sanders et al., 1999; Webb et al., 1996)
- [5] H. Sentenac, *Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes*, UMR Agro-M/CNRS/INRA/UM 2, Montpellier.
- [6] GDR Européen «Calcium toolkit coded proteins as drug targets in animal and plant cells».
- [7] Atkinson BG, Walden DB. (1985). *Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress*. Academic Press.
- [8] Burke JJ, Orzech A. (1988). *Plant, cell and environment* ; 11 : 441-444.
- [9] Jones JR, Qualset CO. (1984). *Breeding crops for environmental stress tolerance in applications of genetic engineering to crop improvement*. Eds. Collins G B. and Petolino J G. Martinus Nijhoff, Junks publishers pp. 305-340.
- [10] Levitt J. (1980). *Responses of plants to environmental stress*. Academic Press, 2 vol.
- [11] Key JL, Kosuge T. (1985). *Cellular and molecular biology of plant stress*. Alan Liss, N.Y.
- [12] Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. (1974). *J Mol Biol* ; 84 : 389-98.
- [13] Marmiroli N, Lorenzoni C, Stanca AM, Terzi V. (1989). *Preliminary study of the inheritance of temperature stress proteins in barley*. *Plant Science* ; 62 : 147- 156.
- [14] Sachs MM, Tuan-Hua David HO (1986). *Alteration of gene expression during environmental stress in plants*. *Ann Rev Plant Phys* ; 37 : 363-376.
- [15] Marmiroli N, Di Cola G, Lorenzoni C. et al. (1988). *Cloning of cereal stress genes. A molecular approach to plant improvement for adaptation to environmental changes in cereal breeding related to integrated cereal production*. Joma M L. and Sloodmaker L A J. Pudoc, Wageningen.
- [16] Stitt M. et Hurry V. (2002). "A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in Arabidopsis." *Current Opinion in Plant Biology* 5: 199-206.

- [17] Hughes M.A. et Dunn M.A. (1996). "The molecular biology of plant acclimation to low temperature." *J. Exp. Bot.* 47: 291-305.
- [18] (en) Stanley et al., « Antioxidants and the Free Radical Theory of Degenerative Disease », dans *Alternative Medicine and Rehabilitation*, 2003 [texte intégral [archive]].
- [19] (en) D. Chen et al., « Green tea and tea polyphenols in cancer prevention », dans *Front Biosci*, vol. 9, n° 2618, 2004 [texte intégral [archive]].
- [20] (en) M. Laughton et al., « Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability », dans *Biochem. Pharmacol.*, vol. 42, n° 1673-1681, 1991 [texte intégral [archive]].
- [21] (en) Frankel et al., « Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine », dans *Lancet*, vol. 341, n° 454-457, 1993.
- [22] (en) Orgogozo et al., « Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area », dans *Rev. Neurol.*, vol. 153, n° 185-192, 1997.23↑ 3rd international Conference on Polyphenols Applications (2006). The International Society for Antioxidants in Nutrition and Health (ISANH).
- [24] www.memoireonline.com/.../dosage-biochimique-composes-phenoliques-datte-miel-sud-algerie.html
- [25] Harbone J B, Grayer R J, 1988. The flavonoids, *Advances. In: research since 1980*. Harborne J B, Chapman and Hall, London, 1-20 p.
- [26] Salunkhe, DK, 1990. *Dietary tannins: consequences and remedies*. Boca Raton, Florida: CRC press.
- [27] REINALDO N., THENZA C...M., GINA S.N. Pharmacological action of tannic acid and gallic acid. *Planta medicina*, 1986, 04, 247-342.
- [28] NONGONIERMA A. Contribution à l'étude biosystématique du genre acacia (mimosacées) en Afrique occidentale. Thèse de doctorat ès-sciences naturelles, Dakar, 1978.
- [29] NDIAYE SECK Contribution à l'étude des tanins de *Acacia nilotica* (var *adansonii*) extraction et dosage des tanins et acide gallique du fruit.
- [30] NGOM N.M. Essai clinique randomisé d'*Acacia nilotica* versus fluconazole dans le traitement de la candidose bucco oesophagienne chez les personnes vivant avec le VIH/SIDA à Dakar. Thes. Pharm., 2000; n° 19.
- [31] Frankel E N, Waterhouse A L, Teissedre P L, 1995. *Agric. Food. Chem.*, 43,221-235 p.
- [32] Hagerman A.E. Radial diffusion method for determining tannins in plant extracts. *J. Chem. Ecol.* 1987, 13 : 437-449.
- [33] www.gdr2688.ups-tlse.fr/cours/cours_calcium_2001.pdf -

- [34] Inoue K. and Hagerman A.E. Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry* 1988, 169 : 363-369.
- [35] www.folkd.com/.../www.books.google.com%2Fbooks%3Fisbn%3D3822825883... –
- [36] Porter L.J., Hrstich L.N. and Chan B.G. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986, 25 : 223-230.
- [37] Bethke, P.C. and Jones, R.L. (1994). Ca^{2+} -calmodulin modulates ion channel activity in storage protein vacuoles of barley aleurone cell. *Plant* 6, 277-285.
- [38] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Calmoduline> –
- [39] Taberero, L., Taylor, D. A., Chandross, R. J., VanBerkum, M. F., Means, A. R., Quioco, F. A., Sack, J. S. (1997) *Structure* 5, 613
- [40] Wilson, M. A. & Brunger, A. T. (2000) *J.Mol.Biol.* 301, 1237
- [41] O.T. Avery, C.M. McLeod et M. McCarthy, « Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III », dans *J. Exp. Med.*, vol. 79, 1944, p. 137-158
- [42] http://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_désoxyribonucléique -
- [43] http://fr.wikipedia.org/wiki/Génome_mitochondrial -
- [44] <http://ead.univ-angers.fr/~jaspard>
- [45] International Human Genome Sequencing Consortium, 2004: Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature* 431: 931-945
- [46] Michele Clamp, « Working the (Gene Count) Numbers_ Finally, a Firm Answer », dans *Science*, vol. 316, n° 5828, 2007, p. 1113 [texte intégral [archive]]
- [47] http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html [archive] Gènes humains sur Ensembl
- [48] What is a gene ? [archive] Mark B. Gerstein et coll, *Genome Research*
- [49] ^{a, b, c, d et e} "La régulation des gènes, moteur de l'évolution", Sean Carroll, Benjamin Prud'homme et Nicolas Gompel, *Pour la Science*, n°375, 01/2009, p48-59
- [50] <http://www.johnkyrk.com/DNAtranscription.html> -
- [51] [http://fr.wikipedia.org/.../Transcription_\(biologie\)](http://fr.wikipedia.org/.../Transcription_(biologie)) -
- [52] <http://fr.wikipedia.org/wiki/Transcription> -
- [53] *Biologie cellulaire*, Dunod 2^e éd, JC Callen, p87 et *Biologie cellulaire et moléculaire*, Dunod 2^e éd, Bolsover, Hyams, Shepard, White, Wiedemann, p120

- [54] D. Pribnow (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 784-788
- [55] www.net-iris.fr/.../120-pouvoir-aux-fins-de-representation-lors-une-assemblee-actionnaires-ou-associes.php
—
- [56] Reddy ASN. Calcium: silver bullet in signaling Plant Sci 2001 ; 160 : 381-404.
- [57] Snedden WA, Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. New Phytol 2001 ; 151 : 35-66.
- [58] Ranty B, Aldon D, Galaud JP. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals. Plant Signal Behav 2006 ; 1 : 96-104.
- [59] Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, et al. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. Science 2000 ; 290 : 142-4.
- [60] Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Zik M, et al. The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein. EMBO J 1999; 18: 1996-2007.
- [61] Yoo JH, Park CY, Kim JC, et al. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in Arabidopsis. J Biol Chem 2005; 280: 3697-706.
- [62] Meyer, T. and Stryer, L. (1991) Calcium spiking. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 20, 153±174
- [63] Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. and Healy, J. I. (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. Nature (London) 386, 855±858
- [64] L. Aravind and E.V. Koonin, Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches, J. Mol. Biol. 287 (1999), pp. 1023–1040.
- [65] C.W. Muller, F.A. Rey, M. Sodeoka, G.L. Verdine and S.C. Harrison, Structure of the NF-κB p50 homodimer bound to DNA, Nature 373 (1995), pp. 311–317. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (304)
- [66] G. Ghosh, G. van Duyne, S. Ghosh and P.B. Sigler, Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site, Nature 373 (1995), pp. 303–310. View Record in Scopus | Cited By in Scopus (332)
- [67] S.G. Sedgwick and S.J. Smerdon, The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework, Trends Biochem. Sci. 24(1999), pp. 311–316.
- [68] A.M. Rubstov and O.D. Lopina, Ankyrins, FEBS Lett. 482 (2000), pp. 1–5.
- [69] K. Song, J. Backs, J. McAnally, X. Qi, R.D. Gerard, J.A. Richardson, J.A. Hill, R. Bassel-Duby and E.N. Olson, The transcriptional coactivator CAMTA2 stimulates cardiac growth by opposing class II histone deacetylases, Cell 125 (2006), pp. 453–466.

- [70] A.R. Rhoads and F. Friedberg, Sequence motifs for calmodulin recognition, *FASEB J.* 11 (1997), pp. 331–340. View Record in Scopus |Cited By in Scopus (413)
- [71] M. Bahler and A. Rhoads, Calmodulin signaling via the IQ motif, *FEBS Lett.* 513 (2002), pp. 107–113.
- [72] Taleb, F. and Fromm, H. (2004). Calcium/calmodulin binding transcription activators in plants and animals. Bios Scientific Publishers, Abingdon.
- [73] Da Costa e Silva, O. (1994). CG-1, a parsley light-induced DNA-binding protein. *Plant mol. Biol.* 25, 921–924.
- [74] T. Yang and B.W. Poovaiah, A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signalling pathways in plants, *J. Biol. Chem.* 277 (2002), pp. 45049–45058.
- [75] Bioinformatics. Collaborative Virtue University Education Program. 24 juillet 2001.
- [76] Muskat, Brenda and Ng, David. Online Bioinformatics Resources to Analyse Your Scientific Data. Genetics and Genomic Biology/Bioinformatics Supercomputing Centre. The Hospital for Sick Children, Toronto. 24 juillet 2001.
- [77] Howard, Ken. The Bioinformatics Gold Rush. *Scientific American*. Juillet 2000. 24 juillet 2001.
- [78] Bioinformatics. Biotech: Life Sciences Resources and Reference Tools. 11 juillet 2001.
- [79] Bioinformatics Applications. University of Colorado Bioinformatics Homepage. 17 juillet 2001.
- [80] Reimer, Ulf and Fullen, Georg. Bioinformatics in a Nutshell. Bioinformatics for Everyone WWW Pages. 17 juillet 2001.
- [81] Steffen, David Ph.D. An Introduction to Biocomputing. October 1996. 23 juillet 2001.
- [82] Fields & Johnston (2002) "Genomics : A Crisis in Postgenomic Nomenclature" *Science* 296, 671 - 672
- [83] Kanehisa & Bork (2003) "Bioinformatics in the post-sequence era" *Nature Genetics* 33, 305 - 310
- [84] Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- [85] Gautier C., Gouy M., Jacobzone M. and Grantham R. (1981). *Nucleic acid sequences handbook*. Praeger Publishers, London.
- [86] Hamm G.H. and Cameron G.N. (1986). The EMBL data library. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5-9.

- [87] Bilofsky H. S., Burks C., Fickett J. W., Goad W. B., Lewitter F. I., Rindone W. P., Swindell C. D. and Tung C. S. (1986). The GenBank genetic sequence databank. *Nucleic Acids Res.*, 14, 1-4.
- [88] George D. G., Barker W.C., and Hunt L.T. (1986). The protein identification resource (PIR). *Nucleic Acids Res.*, 14, 11-15.
- [89] Bairoch A. and Boeckmann B. (1993). The SWISS-PROT protein sequence data bank, recent developments. *Nucleic Acids Res.*, 21, 3093-3096.
- [90] Bairoch A. and Boeckmann B. (1994). The SWISS-PROT protein sequence data bank: current status. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3578-3580.
- [91] fr.wikipedia.org/wiki/Antibiogramme -
- [92] BEZANGER-BEAUQUESNE L., PINKAS M., TORCK M., TROTIN F., 1990. *Plantes médicinales des régions tempérées*. Éd. Maloine.
- [93] www.huiles-essentielles-sante.com/basilic.html -
- [94] www.eona-lab.com/dossiers/...un...therapeutique.../43/ -
- [95] fr.wikipedia.org/wiki/Thym -
- [96] www.pharmapro.ch/fr/N2491/.../thym.html -
- [97] fr.wikipedia.org/wiki/Persil -
- [98] Grieve M. *A Modern Herbal*, 1931. Botanical.com [Consulté le 3 juin 2004].
- [99] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st Edition, 2005.
- [100] USEPA, *Test Method for Escherichia coli and Enterococci in water by the membrane filter procedure*, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH, EPA-600/4-85/076, 1985.