

Des diffusions de fréquences sonores conçues pour cibler des déhydrines induisent la tolérance au stress hydrique de semis de *Pisum sativum*

Victor Prévost a, Karine David b, Pedro Ferrandiz a, Olivier Gallet c, Mathilde Hindié c,*

a Genodics, SAS, 23 Rue Jean-Jacques Rousseau, 75001 Paris, France

b CY Cergy Paris Université, Biology Department, F-95000, Cergy, France

c CY Cergy Paris Université, ERRMECe, F-95000, Cergy, France

* Auteur correspondant.

Adresse E-mail : mathilde.hindie@u-cergy.fr (M. Hindié).

Listes de contenus disponibles sur ScienceDirect

Original en anglais publié par : Heliyon

Page d'accueil du journal : www.cell.com/heliyon

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04991>

Reçu le 17 juillet 2019 ; Reçu sous forme révisée le 23 mars 2020 ; Accepté le 17 septembre 2020
2405-8440/© 2020 Publié par Elsevier Ltd.

Ceci est un article en libre accès sous licence CC BY-NC-ND

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

RÉSUMÉ

Parmi les réponses des plantes au stress induit par l'environnement, la modulation de l'expression des protéines semble être une étape clé de la signalisation inductible. Notre étude s'est concentrée sur une stratégie innovante pour stimuler la résistance des plantes au stress, à savoir l'utilisation de séquences ciblées de fréquences sonores spécifiques.

L'influence de la stimulation acoustique sur la synthèse des protéines végétales a été étudiée. Dans notre étude, des pois verts, *Pisum sativum*, ont été cultivés dans des conditions de stress hydrique avec une stimulation acoustique ciblée. Des séquences acoustiques ciblant les déhydrines (DHN) qui s'accumulent dans les plantes en réponse à la déshydratation ont été étudiées. Nous avons fait des expériences sur l'ensemencement des pois avec deux séquences sonores différentes : la première correspondait à la protéine apparentée à la DHN et la seconde visait la séquence consensus de la DHN. L'allongement des pousses après la germination des graines de pois a été estimé par la prise de poids à l'état frais étudiée en présence de diverses conditions d'exposition aux deux séquences de sons. L'expression de la DHN dans les pois a été quantifiée par des tests ELISA et par Western-blotting en utilisant des anticorps spécifiques.

Une augmentation significative du poids frais des pois cultivés sous exposition à la séquence sonore apparentée à la DHN a été observée, alors que la séquence sonore consensuelle n'a eu aucun effet sur la croissance. En outre, la quantité de DHN à 37 kDa a été augmentée dans les pois traités avec la séquence acoustique consensuelle. Ces résultats suggèrent que l'expression de la DHN pourrait être spécifiquement modulée par un stimulus acoustique approprié.

1. Introduction

Contrairement aux animaux qui peuvent s'échapper lorsqu'ils sont exposés à des contraintes environnementales, les plantes, qui sont enracinées dans le sol, doivent généralement faire face à un environnement changeant.

C'est pourquoi les plantes développent des mécanismes plus nombreux et plus spécifiques pour s'adapter aux stress biotiques (parasites, symbiotes, etc.) et abiotiques (lumière, sécheresse, température). Parmi les

stress abiotiques, il est maintenant bien établi que les plantes sont sensibles aux stimuli physiques et mécaniques (par exemple le vent, le toucher, les vibrations, les sons).

L'impact sonore sur les plantes a été étudié pendant des décennies, avec un intérêt croissant attesté par des études récentes sur l'interaction plante-son [1, 2]. Bien que la perception des sons par les plantes ait souvent été abordée d'un point de vue purement mécanique et associée à la mécano-perception générale [3, 4], certains chercheurs ont étudié la sensibilité des plantes à des stimulations acoustiques spécifiques.

Ces études sur l'influence des sons sur les plantes pourraient être divisées en deux groupes :

- Principalement les effets de fréquences spécifiques [5, 6, 7, 8, 9].
- Plus rarement, impact de séquences musicales [10].

L'influence des ondes sonores a été principalement considérée par les chercheurs comme une stimulation mécanique qui module le comportement des plantes. L'amplitude du son doit également être prise en compte lorsque les ondes sonores sont appliquées aux plantes. Différentes fréquences sonores appliquées à un même type de plante entraînent différentes adaptations développementales et physiologiques, notamment des changements transcriptomiques, protéomiques et hormonaux utilisés pour augmenter la croissance et la production des plantes [9, 11, 12].

Cette perception des sons chez les plantes est associée à des réactions métaboliques spécifiques. Un résumé de ces études et de leurs méthodes, fourni par A.A. Fernandez-Jaramillo et al [2], révèle que les métabolismes spécifiques des plantes peuvent être régulés à la hausse ou à la baisse par des sons spécifiques entre 20 Hz et 500 kHz. La plupart des études examinées montrent un effet significatif des sons audibles (20Hz-20 kHz) sur diverses fonctions telles que le tropisme des racines, la production de polyamine, l'absorption d'O², la régulation hormonale, la maturation des fruits, la germination, la quantité d'ATP.

De plus, l'idée d'obtenir des sons et des mélodies à partir de modèles biologiques a été explorée à travers diverses tentatives d'identification et de visualisation de motifs musicaux dans des organismes vivants. La recherche de motifs musicaux dans les gènes [13, 14, 15, 16], les fonctions biologiques [17], le microbiote écologique [18] et les séquences de protéines ont fourni une série de nouveaux outils pour représenter les données biologiques [19, 20], ainsi qu'une confirmation cohérente du lien sous-jacent entre les motifs musicaux et les structures biologiques.

Ces études sont arrivées à la même conclusion que les plantes étudiées sont capables de percevoir distinctement diverses fréquences sonores, et sont également capables d'avoir une réaction métabolique à des sons complexes et riches en informations tels que des séquences musicales [21].

Un autre aspect physique moins bien étudié de la stimulation acoustique des organismes est l'influence de la résonance harmonique de ces séquences.

Récemment, l'influence de telles séquences composées de fréquences spécifiques a été testée sur des cellules cancéreuses humaines avec des résultats significatifs dans la réduction de leur prolifération [22].

Sur la base de ces précédents rapports, nous avons décidé d'étudier l'influence de séquences acoustiques spécifiques sur le comportement des plantes. Notre modèle expérimental a été conçu pour étudier l'effet de séquences de fréquences sonores spécifiques sur le pois vert commun *Pisum sativum*, en ciblant une protéine de résistance au stress hydrique connue sous le nom de déshydrine (DHN) qui est largement présente dans le règne végétal. Les DHN sont une famille de protéines de résistance à la sécheresse présentes sous diverses formes et proportions au cours des cycles de vie du *Pisum sativum* [23, 24]. Le rôle principal de la DHN consiste à réguler le stress hydrique, et l'accumulation de DHN dans les tissus végétaux sous différents types de stress hydrique est bien établie [25, 26, 27]. Le rôle exact de la famille des protéines DHN n'a pas encore été expliqué. Les DHN sont connues pour minimiser le développement des macromolécules pendant la déshydratation, les stress ioniques ou osmotiques [28]. Saibi et al [29] ont également signalé la régulation des activités de la protéase dans la DHN de *Arabidopsis thaliana*

transgénique sous stress salin par rapport à la variété sauvage. Il a également été démontré qu'une DHN *Vitis riparia* surexprimée lors de stress abiotique était capable de protéger l'ADN des dommages causés par le peroxyde d'hydrogène - une source d'oxygène réactif (SOR) - sans interférer avec les fonctions de l'ADN [30]. En outre, il a été récemment démontré que la DHN pouvait agir sur les voies de signalisation du sel et du stress osmotique en tant que régulateur positif (31). Des données récentes ont montré qu'un promoteur inductible de la DHN est surexprimé en cas de stress abiotique comme une température élevée, un stress salin et la sécheresse [32]. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la surexpression de la DHN dépend directement du stress hydrique et que la DHN nouvellement synthétisée interagit avec les macromolécules pour les protéger des dommages liés au stress abiotique causés par les SOR et le peroxyde d'hydrogène.

Deux séquences acoustiques ont été conçues pour cibler deux peptides caractéristiques de deux DHN différentes. Une note a été associée à chaque acide aminé des deux peptides selon les brevets de Sternheimer [33, 34]. Par exemple, la note La-0 est associée à l'acide aminé glycine.

La germination et la croissance précoce des épicotyles de *Pisum sativum* cultivés dans des conditions de stress hydrique et exposés à ces séquences sonores ciblées ont été étudiées. L'impact de cette exposition des pois aux séquences sonores associées à la DHN a été étudié sur les lysats totaux de pois. Les changements dans l'expression de la DHN ont été quantifiés par Western-blotting.

2. Matériel et méthodes

2.1. Paramètres expérimentaux

Chaque expérience a été menée simultanément sur deux lots de pois distincts. Pour éviter toute contamination phonique, chaque lot a été isolé acoustiquement de l'autre. Chaque lot était constitué de plateaux de germination dans lesquels les graines de *P. sativum* Primavil (Vilmorin, France) étaient plantées dans un substrat de vermiculite hydratée. Les cultures de pois ont été réalisées pendant 8 jours sans aucun arrosage, ce qui a permis d'obtenir un stress hydrique homogène sur les épicotyles en croissance.

En utilisant des fréquences calculées à partir de la masse de chaque acide aminé, un modèle de sons spécifiques conçus pour interagir avec les organismes vivants a été développé et breveté par J. Sternheimer [34]. Toutes ces séquences ont été obtenues à partir d'une méthode brevetée et ont été soumises au droit d'auteur et au copyright. Cette méthode a été conçue pour composer une séquence sonore, corrélée avec la séquence des masses de chaque acide aminé dans une protéine spécifique, afin de réguler la synthèse de la protéine ciblée. Ces séquences sonores ont été stockées sur des cartes mémoire identiques (SanDisk 4 Go) au format audio MP3.

Un protocole en aveugle a été établi à partir de cette étape de l'expérience : des cartes contenant les séquences sonores ont été distribuées de manière aléatoire entre les deux lots, c'est-à-dire "séquence de stimulation" dans un lot et "séquence de contrôle" dans l'autre, qui ne devaient être révélées qu'après analyse des données. Notre approche technique est schématisée dans la figure 1.

En outre, trois opérateurs différents étaient chargés de répartir les séquences, de récolter les données et de les analyser respectivement, ce qui a permis de constituer une procédure en aveugle rigoureuse [35].

Les séquences étaient automatiquement diffusées au même volume (volume de diffusion de 15%) par des haut-parleurs (puissance maximale de 80 W de Kenford) connectés à un lecteur de musique, pendant cinq minutes chaque nuit.

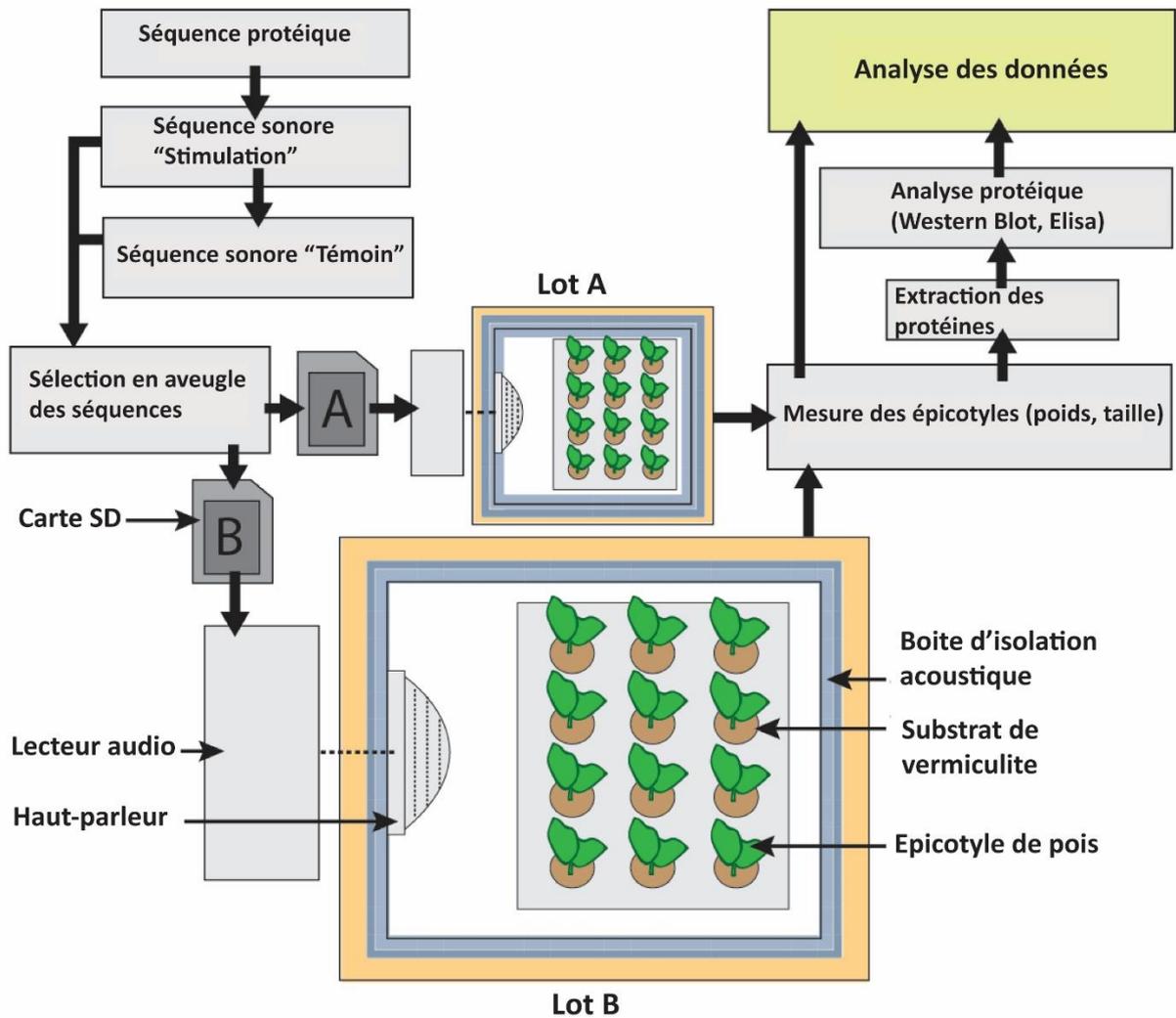


Figure 1. Schéma décrivant la procédure d'expérimentation utilisée.

2.2. Séquences sonores de protéines

L'expérience consistant à exposer *Pisum sativum* à des séquences sonores de protéines a été divisée en deux sous-expériences. Tout d'abord, afin de quantifier l'effet de la séquence sonore sur la croissance des plantes en cas de stress hydrique, nous nous sommes concentrés sur une protéine spécifique de résistance au stress hydrique appelée DHN cognate [36]. Parmi les séquences de DHN-cognate, nous avons choisi un extrait de 25 acides aminés commun à plusieurs DHN de Fabaceae. Ensuite, nous avons ciblé 19 acides aminés de la séquence consensus riche en lysine, précédemment décrite dans toutes les DHN végétales identifiées et pour lesquelles des anticorps spécifiques sont disponibles dans le commerce.

- Croissance et résistance au stress

Les séquences sonores ont été obtenues à partir de la succession des acides aminés dans la partie sélectionnée de la protéine selon la méthode susmentionnée. Les 25 premiers acides aminés de la DHN cognate du *Pisum sativum* ont été convertis en la séquence des notes suivantes (La-3 = 440 Hz) :

Acides aminés du DHN-cog : M A E E N Q N K Y E E T T S A T N S E T E I K D R.

Notes associées : La-3 / Do-3 / La-3 / La-3 / Sol-3 / La-3 / Sol-3 / La-3 / Do-4 / La-3 / La-3 / Fa-3 / Fa-3 / Mi-3 / Do-3 / Fa-3 / Sol-3 / Mi-3 / La-3 / Fa-3 / La-3 / Sol-3 / La-3 / Sol-3 / La-3 / Sol-3 / Do-4.

- Stimulation de la DHN

Afin de réguler positivement la synthèse du pool de DHN du *Pisum sativum*, le fragment consensuel de poly-lysine (poly-K) commun à toutes les DHN a été choisi [25].

Les 19 premiers acides aminés de ce fragment consensuel ont été convertis en la séquence des notes suivantes :

Acides aminés de la poly-K : T G E K K G I M D K I K E K L P G Q H.

Notes associées : Fa-3 / La-2 / La-3 / La-3 / La-3 / La-2 / Sol-3 / La-3 / Sol-3 / La-3 / Sol-3 / La-3 / La-3 / La-3 / Sol-3 / Fa-3 / La-2 / La-3 / Si-3b.

- Séquences de contrôle

Les "séquences de contrôle" ont été déduites de la "séquence DHN-cog" et de la "séquence de stimulation DHN". Ces séquences étaient respectivement de même longueur et contenaient les mêmes notes, mais elles étaient jouées dans un ordre aléatoire.

Toutes ces séquences de notes ont ensuite été enregistrées au format MIDI, mises en boucle afin d'atteindre une durée de cinq minutes pour chacune, puis converties au format MP3.

2.3. Récolte et mesure

Les plantes ont été cultivées pendant huit jours avant d'être récoltées. Pendant la récolte, chaque épicotyle a été retiré individuellement du substrat ; la vermiculite a été lavée des racines sous l'eau courante. Chaque plante a été délicatement séchée avec du papier absorbant avant d'être pesée. Après les mesures, les plantes ont été stockées à - 80 °C.

2.4. Extraction des protéines

Les plantes entières congelées ont été broyées dans un broyeur à lames à - 8 °C avec un tampon d'extraction froid (TRIS 10 mM, pH 7,5 + 3mM PMSF dissous dans de l'acétone ; 0,2 ml/g de cocktail inhibiteur de protéase P9599 Sigma) à 1,5 ml de tampon d'extraction par g de germes frais. Après avoir obtenu une solution homogène, nous l'avons filtrée sur de la gaze (x 2 couches). Le filtrat a été centrifugé (6.000 g, 20 min, 4 °C). Le surnageant a été récupéré et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant final a été récupéré.

Nous avons utilisé la propriété de résistance aux chocs thermiques de la DHN pour concentrer la solution finale avec les protéines ciblées. La solution précédemment récupérée a été placée dans un bain d'eau agité (10 min 70 °C) afin de précipiter les protéines non résistantes aux chocs thermiques selon la méthode de purification expérimentée par Ismail, A. M. et al [37]. La solution a ensuite été centrifugée (17 000 g 1 h 4 °C) et le surnageant soigneusement récupéré et stocké (-20 °C). Les concentrations en protéines de chaque extrait protéique ont été préalablement quantifiées par le test de Bradford.

2.5. Essai immuno-enzymatique (ELISA)

La quantité de DHN dans chaque échantillon a été quantifiée par ELISA indirect. 100 µl d'extraits protéiques dilués dans un tampon de carbonate (pH 9,4) à une concentration de 20 µg/ml ont été appliqués sur des plaques Maxisorp® 96 (NUNC) et ont été incubés pendant la nuit à 4 °C selon la méthode développée par Hnasko R. et al [38]. Les plaques ont été lavées quatre fois avec une solution saline tamponnée au Tris avec 0,1 % de Tween-20 (TBST) à température ambiante. Les puits ont été bouchés pendant 1 heure à 25 °C avec du TBST complété par 10 % de lait écrémé en poudre. Les puits ont ensuite été aspirés et 100 µl de l'anticorps primaire anti-DHN (ADI-PLA-100 Enzo Scientific) dilué au 1/1000 dans du TBST complété avec 0,1 % de lait écrémé en poudre ont été appliqués. Après une heure d'incubation à 25 °C, les puits ont été lavés quatre fois avec de la TBST. Ensuite, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (NA934V GE) au 1/5000 dilué dans du lait écrémé à 0,1 % ajouté à la TBST a été incubé 1 h à 25 °C. Quatre lavages avec la TBST ont été effectués et les anticorps ont été révélés avec un substrat de tétraméthylbenzidine

(T0440 Sigma) pendant 30 min à 37 °C, la réaction a été arrêtée avec 100 µl de HCl 1N et les mesures ont été prises à 450 nm.

2.6. Western blot

La solution de protéines de pois enrichie en DHN a été mélangée avec un tampon Laemli (4X) et chargée sur un gel de polyacrylamide à 12 % à 20 µg par puits.

Après la SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'une cellule trans-blot (Bio-Rad). Une coloration au Ponceau Red a ensuite été effectuée pour vérifier le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose.

Une image de chaque membrane a été acquise à l'aide d'un imageur (Image Quant LAS 500 GE) pour obtenir la quantification des protéines chargées totales. La surface de la membrane a ensuite été saturée dans une solution de 5 % p/v de lait écrémé en poudre, 0,1 % v/v de PBS + Tween-20 (2h). La membrane a été lavée avec du PBS + Tween-20 (0,1 % v/v) et incubée (pendant la nuit, 8 °C) avec un anticorps de lapin anti-DHN polyclonal (ADI-PLA-100 Enzo Scientific) à une dilution au 1/1000 dans du lait écrémé en poudre à 5 % p/v, 0,1 % v/v PBS + Tween-20. Après incubation, la membrane a été lavée avec du PBS + Tween-20 (0,1 % v/v), puis incubée pour révéler les liaisons spécifiques des anticorps avec l'anticorps de lapin conjugué à la phosphatase alcaline (A3687 Sigma) (dilution au 1/5000 dans un tampon de saturation pendant 1 h). L'activité de la phosphatase a été détectée à l'aide d'un kit de réactifs colorés Bio-Rad AP et quantifiée avec le logiciel Image Studio®. Le signal normalisé a été calculé en utilisant la quantification de la protéine totale précédemment effectuée avec la coloration Ponceau Red.

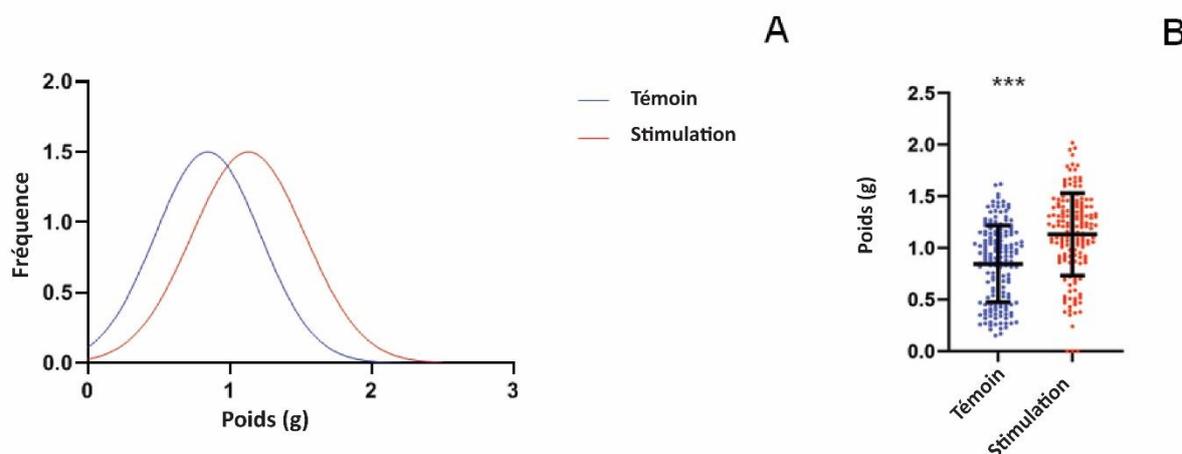


Figure 2. Effet du traitement acoustique sur des pois soumis à un stress hydrique et cultivés pendant 8 jours dans l'obscurité. La séquence acoustique correspond à la DHN-cognate.

A : Distribution des fréquences de poids, les couleurs rouge et bleue indiquent respectivement la séquence de "stimulation" et de "contrôle".

B : Le poids des pois a été mesuré pour chaque condition de culture ; des analyses ont été effectuées sur 3 répliques biologiques.

Les moyennes des données sont présentées avec les écarts-types. Les étoiles montrent des différences significatives ($p < 0,01$) comme déterminé par le test t de Student.

2.7. Détection et analyse des signaux

Les résultats sont présentés sous la forme de trois expériences indépendantes avec des écarts types (ET). Chaque expérience a été répétée au moins trois fois. Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de tests t bilatéraux non appariés de Student. Tous les tests statistiques et les graphiques ont été générés à l'aide de Prism8 (GraphPad).

3. Résultats et discussion

3.1. Effet des séquences acoustiques sur la croissance des pois

Les effets des stimulations acoustiques sur la croissance des pois ont d'abord été testés avec des cultures dans l'obscurité. L'analyse de l'effet des séquences de "stimulation" ou de "contrôle" sur la germination des pois cultivés pendant 8 jours sous stress hydrique a mis en évidence une différence significative dans la distribution de fréquence du poids de l'épicotyle, comme le montre la figure 2. Les pois recevant les séquences acoustiques correspondant à la séquence de "stimulation" DHN-cog ont présenté des valeurs de poids plus élevées que ceux cultivés sous la séquence acoustique "contrôle".

Les poids moyens d'épicotyle étaient significativement plus élevés pour la "stimulation DHN-cog" (population (0,37 g +/- 0,15 g) par rapport à la population "témoin" (0,33 g +/- 0,18 g)). Les données présentées sont les résultats de 3 expériences différentes avec pas moins de 340 épicotyles pour chaque condition.

Dans une deuxième série d'expériences, les pois ont été cultivés pendant 8 jours à la lumière du jour sous stress hydrique en présence soit de la "stimulation DHN-cognate", soit de la séquence acoustique "témoin" (figure 3). Le poids des pois entiers a été mesuré et des différences ont été observées : les pois cultivés avec la stimulation acoustique "DHN-cognate" étaient significativement plus lourds (1,13g +/- 0,39g, n = 167) par rapport aux pois témoins (0,84g +/- 0,37g, n = 167).

Dans les deux expériences, un gain de poids des épicotyles de pois a été observé en présence de la stimulation acoustique DHN-cog. La croissance des pois n'a pas été influencée par un apport lumineux puissant mais par la stimulation acoustique.

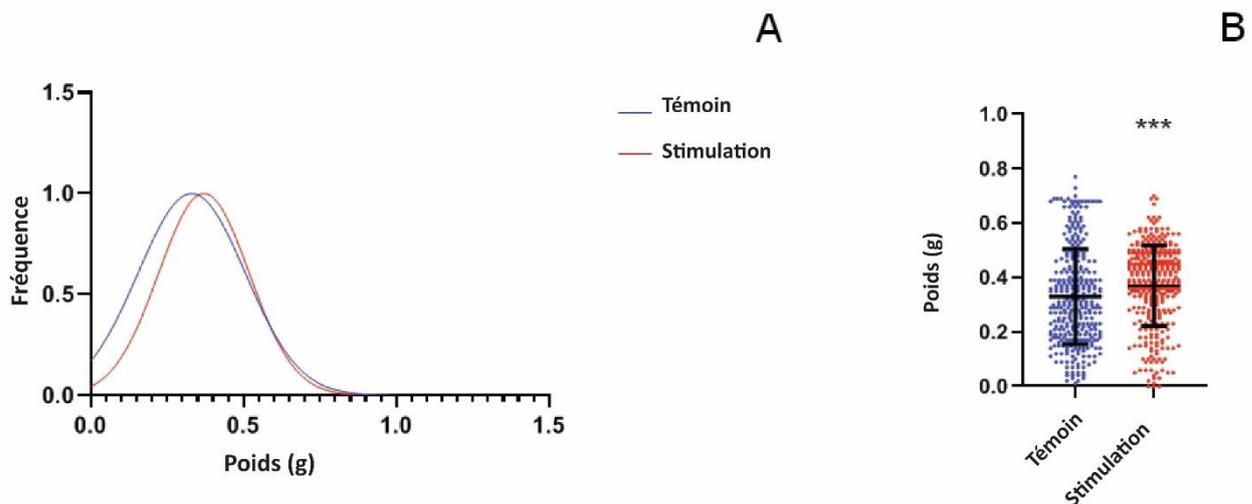


Figure 3. Effet du traitement acoustique sur des pois soumis à un stress hydrique et cultivés pendant 8 jours à la lumière du jour. La séquence de DHN-cognate a été utilisée pour la stimulation acoustique.

A : Distribution des fréquences de poids, les couleurs rouge et bleue indiquent respectivement les séquences de stimulation et de contrôle.

B : Le poids des pois a été déterminé pour chaque condition de culture ; des analyses ont été effectuées sur 3 répliques biologiques. Les moyennes des données avec les écarts-types sont présentées. Les étoiles montrent des différences significatives ($p < 0,01$) comme déterminé par le test t de Student.

Les pois ont ensuite été cultivés dans des conditions de sécheresse et dans l'obscurité pendant 8 jours, et la séquence DHN-consensus a été utilisée pour la stimulation acoustique.

Des cultures témoins ont été effectuées en l'absence de la séquence DHN-consensus de "stimulation" et ont été exposées à la séquence "témoin" correspondante. Contrairement aux résultats précédents obtenus avec la séquence de "stimulation" de la DHN-cognate, aucune différence significative n'a été observée sur la croissance des épicotyles. Le poids moyen de la population de pois cultivés avec la séquence de

"stimulation" de la DHN-consensus (1,03 g +/- 0,26 g n = 476) était comparable à celui du témoin (1,04 g +/- 0,23 g n = 478). Les données présentées sont les résultats de 4 expériences différentes avec pas moins de 476 épicotyles pour chaque condition. La stimulation acoustique de la DHN-consensus n'a pas produit de changement de poids significatif chez les pois cultivés dans l'obscurité dans des conditions de stress hydrique comme on le voit sur la figure 4.

C'est pourquoi la même contrainte hydrique a été appliquée dans toutes les séries d'expériences avec seulement des changements dans la séquence acoustique appliquée. Ainsi, le gain de poids observé dans les pois cultivés avec la séquence de "stimulation" de la DHN était spécifiquement dû à la séquence de stimulation acoustique appliquée. Comme les mêmes notes jouées dans un ordre aléatoire n'ont pas influencé le poids des pois comme on l'a observé dans les échantillons témoins, nous concluons que le gain de poids présenté dans les figures 2 et 3 a été induit par la séquence de stimulation acoustique spécifique à la DHN-cognate jouée pendant les expériences.

En outre, la séquence de la DHN-cognate utilisée dans cette étude, qui est commune à certaines Fabaceae, contenait à la fois l'extrait de 25 acides aminés spécifiques de la Fabacea (acides aminés de la DHN-cog) et celui de la poly-K de DHN-consensus de la plante. Nous émettons l'hypothèse que le gain de poids observé a été induit par l'ensemble des DHN exprimées dans le pois.

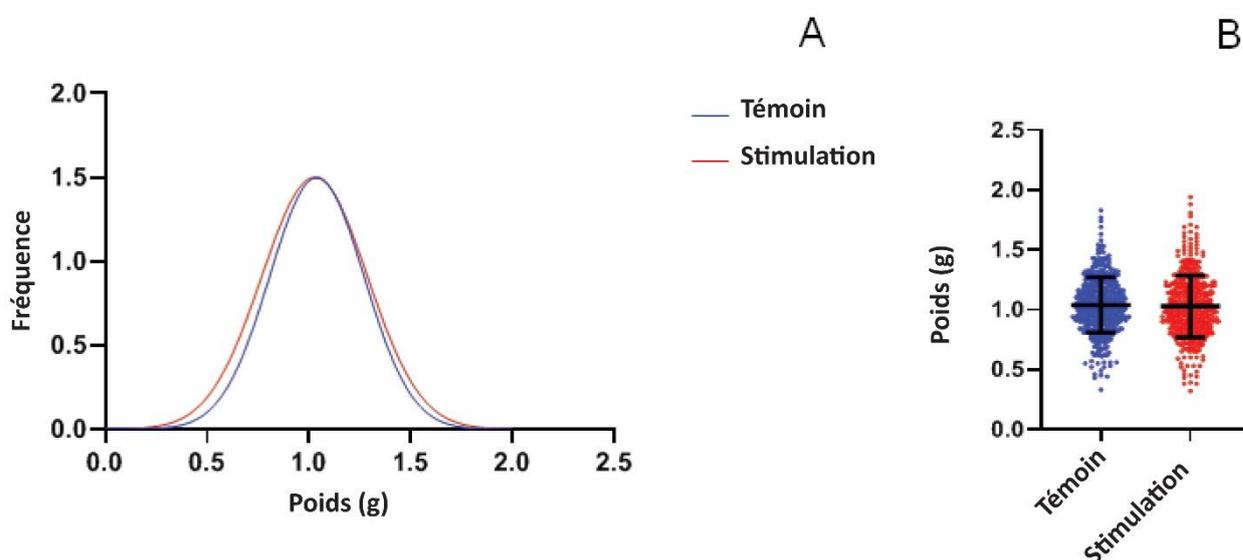


Figure 4. Effet du traitement acoustique sur des pois soumis à un stress hydrique et cultivés pendant 8 jours dans l'obscurité. La séquence de la DHN-consensus a été utilisée pour la stimulation acoustique.

A : Distribution des fréquences de poids ; les couleurs rouge et bleue indiquent respectivement les séquences de stimulation et de contrôle.

B : Le poids des pois a été déterminé pour chaque condition de culture ; des analyses ont été effectuées sur 4 répliques biologiques. Les moyennes des données avec les écarts-types sont indiquées.

3.2. Analyse de la DHN exprimée dans les pois sous traitement sonore

Nos résultats ont démontré un effet de la séquence acoustique associée à la DHN sur le poids des pois frais. L'expression de la DHN dans les pois cultivés a ensuite été étudiée afin de déterminer si elle était directement modifiée par la stimulation acoustique de la DHN-consensus. Dans un premier temps, des tests ELISA ont été effectués pour quantifier l'expression de la DHN dans les pois après stimulation acoustique. Les anticorps anti-déshydrine disponibles ont été dirigés vers le segment poly-K des déshydrines consensus. Par conséquent, seuls les tests ELISA effectués sur des pois stimulés par la stimulation acoustique correspondant à la séquence consensus sont présentés. En revanche, même si la DHN-cognate présente une séquence consensus poly-K, elle a été faiblement reconnue par les anticorps commerciaux ; aucune donnée exploitable n'a été obtenue avec un extrait de pois stimulés par la DHN-cognate (données non présentées).

Comme les anticorps polyclonaux contre le segment poly-K de la DHN-consensus utilisée pour les tests ELISA sont capables de se lier à toutes les formes de DHN présentes dans l'extrait de pois, toutes les DHN ont pu être détectées, y compris celles qui ne sont pas directement corrélées au stress hydrique induit dans notre modèle. Plus de trois formes différentes de DHN ont été détectées dans *Pisum sativum* et leur synthèse n'a pas été simultanée [24]. Néanmoins, une légère augmentation de la DHN exprimée dans l'extrait de pois après stimulation acoustique de la séquence consensus a été observée, démontrant une augmentation de la DHN dans les épicotyles comme présenté dans la figure 5.

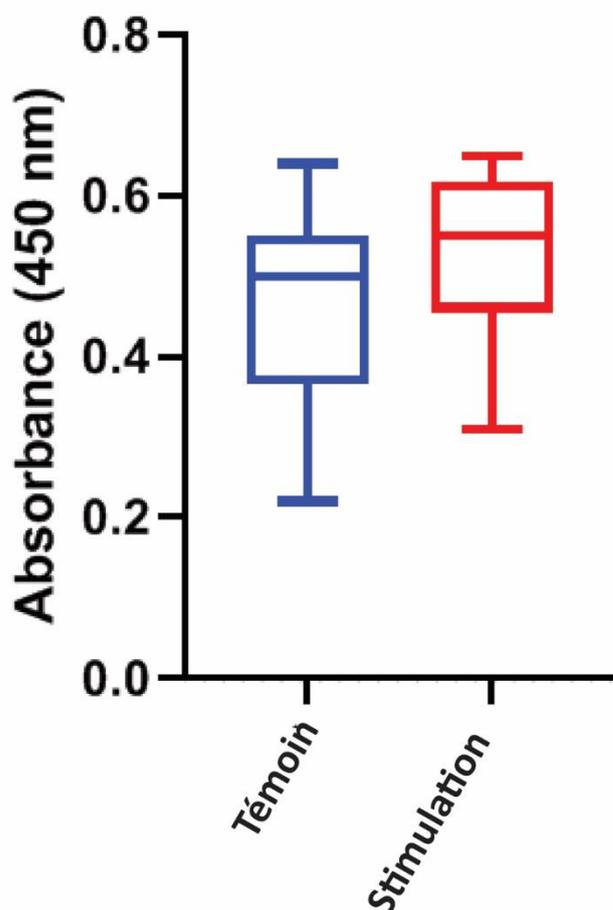


Figure 5. Effet du traitement sonore sur la synthèse de la DHN chez des pois exposés au stress hydrique et cultivés pendant 8 jours dans l'obscurité. La séquence de la DHN-consensus a été utilisée pour la stimulation acoustique. Le niveau de DHN dans les extraits de pois a été quantifié par ELISA. L'expression de la DHN a été quantifiée pour chaque condition de culture, 4 répliquas ont été effectués pour chaque condition. Pour chaque parcelle, la ligne dans la boîte représente la médiane, telle que présentée par Novitsky et al [41]. Les lignes inférieures et supérieures de la boîte représentent respectivement les 25^e et 75^e centiles, et les lignes adjacentes inférieures et supérieures (moustaches) les 10^e et 90^e centiles.

Pour déterminer quel type de DHN pouvait être influencé par la stimulation acoustique, des Western blots ont été effectués sur des lysats de protéines thermostables provenant de pois avec le même anticorps polyclonal confrontés au segment poly-K de la DHN-consensus (figure 6).

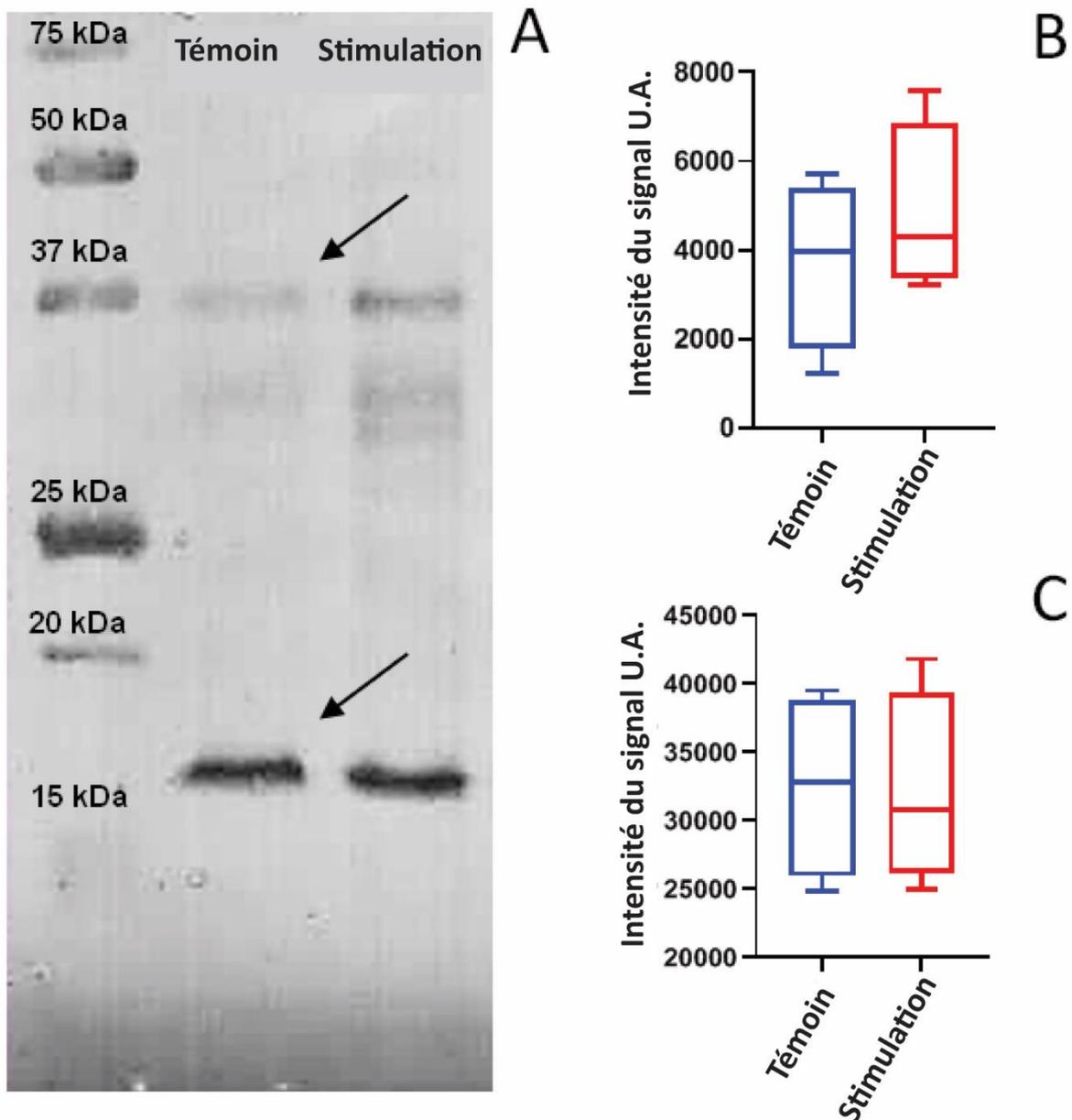


Figure 6. Effet de la stimulation acoustique sur l'expression de la DHN chez des pois soumis à un stress hydrique et cultivés pendant 8 jours dans l'obscurité. La séquence de la DHN-consensus a été utilisée pour la stimulation acoustique. (A) Western-blot représentatif, (B) analyse densitométrique de bandes de DHN de 37 kDa, normalisées par la quantité totale de protéines et (C) analyse densitométrique de bandes normalisées de 15 kDa. Graphiques en boîtes verticales du signal normalisé ($n = 4$). Pour chaque tracé, la ligne à l'intérieur de la boîte représente la médiane. Les lignes inférieures et supérieures de la boîte représentent respectivement les 25^e et 75^e centiles, et les lignes adjacentes inférieures et supérieures (moustaches) les 10^e et 90^e centiles.

Parmi les protéines d'épicotyles de pois collectées, trois bandes de protéines ont été reconnues par l'anticorps anti-DHN. Ces bandes ont été identifiées avec un poids moléculaire de 37 kDa, 27-30 kDa (comme observé par Garnzczarska et al [23]) et 15 kDa respectivement (Figure 6). Comme le doublet de bande 27-30 kDa semble faible (mais renforcé dans les conditions stimulées), il n'a pas été étudié plus avant. Le niveau d'expression des protéines de 37 kDa et de 15 kDa a été mesuré par densitométrie et les signaux ont été normalisés en utilisant des colorants de protéines totaux. La bande de 37 kDa de DHN a révélé une quantité de DHN dans les échantillons de la "séquence de stimulation" par rapport aux échantillons de la "séquence de contrôle", alors que les bandes de 15 kDa étaient identiques pour les deux conditions de culture. Les valeurs normalisées des signaux des bandes ont été directement corrélées avec la quantité de DHN extraite des épicotyles.

Nos résultats suggèrent également une augmentation de la bande située autour de 37 kDa dans le cas de la "séquence de stimulation", par rapport aux pois "témoins" soumis au même stress hydrique. Cela suggère que la "séquence acoustique de stimulation de la DHN" favorise l'expression précoce d'un type de DHN malgré le stress hydrique déjà appliqué.

Une bande de 16 kDa a été bien observée dans chaque essai. L'analyse densitométrique de cette bande n'a montré aucune différence significative entre les deux conditions de culture. Une étude précédente sur la DHN du pin a identifié une concentration constante de 16 kDa de DHN dans des conditions de stress hydrique chez les aiguilles de pin [39]. Des résultats similaires ont également été observés sur le *Cynodon dactylon*, où Suk et al (40) ont démontré que la DHN de 16 kDa contribue à la tolérance à la sécheresse. Bien qu'un tel mécanisme n'ait pas encore été étudié chez *Pisum sativum*, nous supposons que la DHN de 16 kDa est exprimée à un taux constant en réponse au stress hydrique mais ne semble pas être influencée par la stimulation acoustique du segment poly-K de la DHN.

Ces résultats suggèrent une augmentation spécifique de la quantité de la DHN de 37 kDa dans les pois exposés à la "séquence de stimulation de la DHN-consensus", par rapport aux pois exposés à la séquence "contrôle".

4. Conclusions

Pris ensemble, nos résultats suggèrent que l'exposition à une séquence de fréquences acoustiques corrélée avec une séquence d'acides aminés spécifique de la DHN pourrait agir comme un facteur de modulation positif dans l'adaptation du *Pisum sativum* au stress hydrique. En utilisant deux séquences spécifiques corrélées avec la DHN-cognate d'une part, et avec la DHN-consensus d'autre part, nous avons obtenu deux réponses spécifiques en fonction de la stimulation acoustique.

Une augmentation du poids des épicotyles de pois frais a été induite lorsqu'ils ont été exposés à une stimulation acoustique ciblant les 25 acides aminés du peptide DHN-cognate décrit dans plusieurs DHN de Fabaceae.

L'expression des DHN de 37 kDa et de 29-30 kDa dans les épicotyles de pois sous stress hydrique a été augmentée lorsqu'elles ont été exposées aux protéodies corrélées avec les 19 acides aminés du fragment riche en lysine de la protéine DHN-consensus.

Compte tenu, d'une part, des données récentes montrant qu'un promoteur inductible de DHN est surexprimé en cas de stress abiotique [32] et, d'autre part, de nos résultats démontrant l'augmentation de la quantité de DHN sous des stimulations acoustiques spécifiques (protéodies), nous pourrions émettre l'hypothèse que la diffusion des protéodies agit d'une manière spécifique en synergie avec les voies de signalisation du stress hydrique. Ces résultats préliminaires pourraient être approfondis grâce à un suivi précis de l'expression des protéines et des gènes dans des organismes vivants ayant un métabolisme bien défini tels que les bactéries, les champignons, les cellules de mammifères, etc.

Déclarations

Déclaration de contributions des auteurs

V. Prévost, P. Ferrandiz : ont conçu les expériences ; ont réalisé les expériences ; ont analysé et interprété les données ; ont rédigé l'article.

K. David : a réalisé les expériences.

O. Gallet, M. Hindié : ont conçu et organisé les expériences ; ont réalisé les expériences ; ont analysé et interprété les données ; ont fourni des réactifs, du matériel, des outils d'analyse ou des données ; ont rédigé l'article.

L'original en anglais a été traduit en français par Michel Duhamel avec www.DeepL.com/Translator.

Déclaration de financement

M. Hindié a été soutenue par la Fondation UCP (#38-2016 3ProtV_eg), Cergy-Pontoise, France.

Déclaration d'intérêts concurrents

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt.

Informations complémentaires

Aucune information supplémentaire n'est disponible pour ce document.

Remerciements

Les auteurs remercient Nihal Engin Vrana pour ses commentaires utiles sur le manuscrit et Monica Biberson (fancywords.net) pour la relecture.

Références

- [1] [M. Gagliano, S. Mancuso, D. Robert, Towards understanding plant bioacoustics, Trends Plant Sci. 17 \(6\) \(2012\) 323–325. PubMed PMID: WOS:000305854900002.](#)
- [2] [A.A. Fernandez-Jaramillo, C. Duarte-Galvan, L. Garcia-Mier, S.N. Jimenez-Garcia, L.M. Contreras-Medina, Effects of acoustic waves on plants: an agricultural, ecological, molecular and biochemical perspective, Sci. Hortic. 235 \(2018\) 340–348. PubMed PMID: WOS:000430762600040.](#)
- [3] [W.F. Telewski, A unified hypothesis of mechanoperception in plants, Am. J. Bot.: Bot. Soc. Am. Inc \(2015\) 340–348.](#)
- [4] [R.C. Mishra, R. Ghosh, H. Bae, Plant acoustics: in the search of a sound mechanism for sound signaling in plants, J. Exp. Bot. 67 \(15\) \(2016\) 4483–4494. PubMed PMID: WOS:000383233400006.](#)
- [5] [H. Ozkurt, O. Altuntas, The Effect of Sound Waves at Different Frequencies upon the Plant Element Nutritional Uptake of Snake Plant \(Sansevieria Trifasciata\) Plants, 2016.](#)
- [6] [M.J. Jeong, D. Bae, H. Bae, S.I. Lee, J.A. Kim, S.C. Shin, et al., Inhibition of botrytis cinerea spore germination and mycelia growth by frequency-specific sound, J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem. 56 \(4\) \(2013\) 377–382. PubMed PMID: WOS: 000324359100003.](#)
- [7] [J.Y. Kim, J.S. Lee, T.R. Kwon, S.I. Lee, J.A. Kim, G.M. Lee, et al., Sound waves delay tomato fruit ripening by negatively regulating ethylene biosynthesis and signaling genes, Postharvest Biol. Technol. 110 \(2015\) 43–50. PubMed PMID: WOS: 000362919300007.](#)
- [8] [O. Altuntas, H. Ozkurt, The assessment of tomato fruit quality parameters under different sound waves, J. Food Sci. Technol. 56 \(4\) \(2019\) 2186–2194. Epub 2019/ 03/16 PubMed PMID: 30996452; PubMed Central PMCID: PMC6443699.](#)
- [9] [R. Ghosh, R.C. Mishra, B. Choi, Y.S. Kwon, D.W. Bae, S.C. Park, et al., Exposure to sound vibrations lead to transcriptomic, Proteomic Horm. Changes Arabidopsis 6 \(2016\) 33370. Scientific Reports. 2016;6.. PubMed PMID: WOS: 000392062400001.](#)
- [10] [A.R. Chowdhury, A. Gupta, Effect of music on plants – an overview, Int. J. Integr. Sci. Innov. Technol. \(IJIIT\) \(2015\) 30–34.](#)
- [11] [B. Choi, R. Ghosh, M.A. Gururani, G. Shanmugam, J. Jeon, J. Kim, et al., Positive regulatory role of sound vibration treatment in Arabidopsis thaliana against Botrytis cinerea infection, Sci. Rep. 7 \(2017\). PubMed PMID: WOS:000402312200001.](#)
- [12] [R.H.E. Hassanien, T.Z. Hou, Y.F. Li, B.M. Li, Advances in effects of sound waves on plants, J. Integr. Agric. 13 \(2\) \(2014\) 335–348. PubMed PMID: WOS: 000330255300014.](#)
- [13] [A. Sanchez Sousa, F. Baquero, C. Nombela, The making of "the genoma music, Rev. Iberoam. De. Micol. 22 \(4\) \(2005\) 242–248. PubMed PMID: MEDLINE:16499418.](#)

- [14] [M.S. Staege, A short treatise concerning a musical approach for the interpretation of gene expression data, *Sci. Rep.* 5 \(2015\) 13. PubMed PMID: WOS: 000362884100001.](#)
- [15] [D. Brocks, Musical patterns for comparative epigenomics, *Clin. Epigenet.* 7 \(2015\). PubMed PMID: WOS:000360787200002.](#)
- [16] [J. Carey, Musical genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 113 \(8\) \(2016\) 1958–1959. PubMed PMID: WOS:000370620300026.](#)
- [17] [R. Takahashi, J.H. Miller, Conversion of amino-acid sequence in proteins to classical music: search for auditory patterns, *Genome Biol.* 8 \(5\) \(2007\). PubMed PMID: WOS:000246983100036.](#)
- [18] [P. Larsen, J. Gilbert, Microbial bebop: creating music from complex dynamics in microbial ecology, *PLoS One* 8 \(3\) \(2013\). PubMed PMID: WOS:000316936100078.](#)
- [19] [R. Castagna, A. Chiolerio, V. Margaria, Music translation of tertiary protein structure: auditory patterns of the protein folding, *Appl. Evol. Comput. Pt Ii* 6625 \(2011\) 214. PubMed PMID: WOS:000302388200022.](#)
- [20] [J.Y. Wong, J. McDonald, M. Taylor-Pinney, D.I. Spivak, D.L. Kaplan, M.J. Buehler, Materials by design: merging proteins and music, *Nano Today* 7 \(6\) \(2012\) 488–495. PubMed PMID: WOS:000313864800005.](#)
- [21] [K. Creath, G.E. Schwartz, Measuring effects of music, noise, and healing energy using a seed germination bioassay, *J. Altern. Compl. Med.* 10 \(1\) \(2004\) 113–122. PubMed PMID: WOS:000189326900019.](#)
- [22] [I.Y. Orhan, B.A. Gulbahar, Stimulation of protein expression through the harmonic resonance of frequency-specific music, *Clin. Invest. Med.* 39 \(6\) \(2016\) S34–S38. PubMed PMID: WOS:000389725000008.](#)
- [23] [M. Garnczarska, T. Zalewski, L. Wojtyla, A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds, *J. Plant Physiol.* 165 \(18\) \(2008\) 1940–1946. PubMed PMID: WOS:000261943700009.](#)
- [24] [M. Robertson, P.M. Chandler, Pea dehydrins: identification, characterisation and expression, *Plant Mol. Biol.* 19 \(6\) \(1992\) 1031–1044. PubMed PMID: 1387328.](#)
- [25] [S.P. Graether, K.F. Boddington, Disorder and function: a review of the dehydrin protein family, *Front. Plant Sci.* 5 \(2014\). PubMed PMID: WOS:000344797200001.](#)
- [26] [G. Bernacchia, F. Salamini, D. Bartels, Molecular characterization of the rehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*, *Plant Physiol.* 111 \(4\) \(1996\) 1043–1050. PubMed PMID: WOS:A1996VD68800010.](#)
- [27] [M. Hara, The multifunctionality of dehydrins: an overview, *Plant Signal. Behav.* 5 \(5\) \(2010\) 503–508. Epub 2010/02/08. PubMed PMID: 20139737.](#)
- [28] [W. Zhu, L. Zhang, H. Lv, H. Zhang, D. Zhang, X. Wang, et al., The dehydrin *wzy2* promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance, *Funct. Integr. Genom.* 14 \(1\) \(2014\) 111–125. Epub 2013/12/22. PubMed PMID: 24363037.](#)
- [29] [W. Saibi, N. Zouari, K. Masmoudi, F. Brini, Role of the durum wheat dehydrin in the function of proteases conferring salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines, *Int. J. Biol. Macromol.* 85 \(2016\) 311–316. PubMed PMID: WOS: 000370886800036.](#)
- [30] [K.F. Boddington, S.P. Graether, Binding of a *Vitis riparia* dehydrin to DNA, *Plant.* 287 \(2019\). PubMed PMID: WOS:000487165500034.](#)
- [31] [D. Luo, X.M. Hou, Y.M. Zhang, Y.C. Meng, H.F. Zhang, S.Y. Liu, et al., *CaDHN5*, a dehydrin gene from pepper, plays an important role in salt and osmotic stress responses, *Int. J. Mol. Sci.* 20 \(8\) \(2019\). PubMed PMID: WOS:000467648700187.](#)
- [32] [K. Divya, P.B.K. Kishor, P. Bhatnagar-Mathur, P. Singam, K.K. Sharma, V. Vadez, et al., Isolation and functional characterization of three abiotic stress-inducible \(*Apx*, *Dhn* and *Hsc70*\) promoters from pearl millet \(*Pennisetum glaucum* L.\), *Mol. Biol. Rep.* 46 \(6\) \(2019\) 6039–6052. PubMed PMID: WOS:000503243500035.](#)
- [33] [J. Sternheimer, inventeur, Procédé de Régulation épigénétique de la Biosynthèse de Protéines par les Ondes d'Echelle, 2007.](#)
- [34] [J. Sternheimer, À propos du décodage des musiques de protéines, décembre 1990, DOI: 10.13140/RG.2.1.2239.6645.](#)
- [35] [L. Holman, M.L. Head, R. Lanfear, M.D. Jennions, Evidence of experimental bias in the life sciences: why we need blind data recording, *PLoS Biol.* 13 \(7\) \(2015\), e1002190. Epub 2015/07/08. PubMed PMID: 26154287; PubMed Central PMCID: PMC4496034.](#)
- [36] [M. Robertson, P.M. Chandler, A dehydrin cognate protein from pea \(*Pisum sativum* L.\) with an atypical pattern of expression, *Plant Mol. Biol.* 26 \(3\) \(1994\) 805–816. PubMed PMID: 7999996.](#)

- [37] [A.M. Ismail, A.E. Hall, T.J. Close, Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea, Plant Physiol. 120 \(1\) \(1999\) 237–244. PubMed PMID: WOS:000080329200025.](#)
- [38] [R. Hnasko, A. Lin, J.A. McGarvey, L.H. Stanker, A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA, Biochem. Biophys. Res. Commun. 410 \(4\) \(2011\) 726–731. PubMed PMID: WOS:000293204600004.](#)
- [39] [T.D. Tatarinova, A.A. Perk, V.V. Bubyakina, I.V. Vasilieva, A.G. Ponomarev, T.C. Maximov, Dehydrin stress proteins in Pinus sylvestris L. needles under conditions of extreme climate of Yakutia, Dokl. Biochem. Biophys. 473 \(1\) \(2017\) 98–101. PubMed PMID: WOS:000401551800005.](#)
- [40] [K.M. Su, J.Q. Moss, G.L. Zhang, D.L. Martin, Y.Q. Wu, Bermudagrass drought tolerance associated with dehydrin protein expression during drought stress, J. Am. Soc. Hortic. Sci. 138 \(4\) \(2013\) 277–282. PubMed PMID: WOS:000333230200005.](#)
- [41] [V. Novitsky, R. Wang, H. Bussmann, S. Lockman, M. Baum, R. Shapiro, et al., HIV-1 subtype C-infected individuals maintaining high viral load as potential targets for the "test-and-treat" approach to reduce HIV transmission, PloS One 5 \(4\) \(2010\), e10148. Epub 2010/04/12 PubMed PMID: 20405044; PubMed Central PMCID: PMC2853582.](#)