

RÉPONSE PROTÉIQUE D'UNE HALOPHYTE FACE AUX STRESS SALIN

OUIS Miryam et BELKHODJA Moulay
Laboratoire de physiologie végétale, faculté des sciences
Université Es-Senia, Oran, Algérie
E-mail : miryamouis@yahoo.fr- E-mail : moulay2009@yahoo.fr

Résumé- Afin d'évaluer la réponse protéique d'une halophyte *Atriplex halimus* L., des hautes concentrations en sels, 400 et 800 meq de NaCl ont été utilisées. Le comportement protéique des plantes est élucidé après neuf jours de stress à partir des plantes âgées de cinq mois. Les protéines solubles extraites à partir des feuilles, des tiges et des racines sont analysées par la méthode de BRADFORD et par électrophorèse SDS-PAGE. Les résultats obtenus montrent que les protéines s'accumulent plus dans les feuilles des plantes stressées à la salinité. Les analyses des protéines solubles par la technique d'électrophorèse concluent que les taux de polymorphisme les plus intéressants sont enregistrés sur les feuilles des plantes stressées à 800 meq de NaCl avec l'apparition de nouvelles bandes protéique dans les feuilles (46 kDa, 40 kDa et 16 kDa).

Mots clés : Protéines, tolérance, stress salin, halophytes.

PROTEINIC RESPONSE OF A HALOPHYTE INDER SALINE CONDITIONS

Abstract- To evaluate the proteinic answer of a halophyte *Atriplex halimus* L., high salt concentrations made up of NaCl. The proteinic behavior of the plants is elucidated after nine days of stress starting from plants aged five months. Soluble proteins extracted starting from the sheets, stems and roots are analyzed by the method of BRADFORD and by electrophoresis SDS-PAGE. The results show that the proteins accumulate more in the sheets of the plants stressed with salinity. The analyses of soluble proteins by the technique of electrophoresis conclude that the most interesting rates of polymorphism are recorded on the sheets of the stressed plants with 800 NaCl meq with the appearance of new bands proteinic in the sheets (46 kDa, 40 kDa and 16 kDa).

Keywords: Proteins, tolerance, salt tress, halophytes.

Introduction

L'introduction d'arbustes fourragers résistant à l'aridité et tolérant à la salinité, est l'un des moyens utilisés pour la valorisation des terres dégradées [1], de ce fait plusieurs espèces halophytes appartenant au genre *Atriplex*, s'adaptent bien aux conditions environnementales dures et constituent un matériel utile pour l'identification des mécanismes physiologiques et des gènes impliqués dans la résistance aux stress abiotiques [2], tel que la salinité, la sécheresse et le choc thermique [3].

L'ajustement osmotique est l'un des mécanismes adaptatifs principal de ces espèces, qui comporte l'accumulation des molécules en réponse à un stress hydrique [4] grâce à l'induction des gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés comme la proline [5], la glycine bêtaïne [6, 7] des hormones tels que l'acide abscissique [8], des sucres totaux, des sucres réducteurs et des protéines totales [9]. Chez plusieurs espèces végétales, le sel induit également des modifications quantitatives et qualitatives dans la synthèse des protéines détectables par électrophorèse sur gel de polyacrylamide [10].

En effet les protéines sont considérées comme un critère biochimique dans la réaction des plantes lorsqu'elles sont soumises à des contraintes du milieu. Ainsi l'objectif de ce travail est

d'évaluer la réponse protéique de l'espèce *Atriplex halimus* L. conduite sous un stress salin par une analyse quantitative et qualitative des composants protéiques.

1.- Matériel et méthodes

Le matériel de base expérimental concerne une population d'*Atriplex halimus* L. récoltée à l'université d'Es-Senia (Oran). Les plantules sont repiquées dans des pots moyens contenant du terreau et du sable (2V/V) et arrosées par alternation d'eau distillée et la solution nutritive de HOAGLAND à 100% de la capacité de rétention du sol tous les trois jours jusqu'à l'application du stress. Pour chaque traitement, il est réalisé 10 pots: [(2 traitements) × 10 + 10 témoin] = 30 dans l'ensemble.

Les plantes sont soumises aux stress salin composé d'une solution saline de NaCl à 400 et 800 meq.l⁻¹ d'eau distillée. Le lot des plantes témoins est arrosé à la solution nutritive chaque 3 jours à 100% de la capacité de la rétention du sol.

Après 9 jours de l'application du stress salin, il est procédé aux prélèvements des plantes. Les feuilles, les tiges et les racines sont séparées pour la préparation des extraits protéiques. Le dosage des protéines, est effectué selon la technique de BRADFORD [11] où dans un tube à essais on verse 50 ul de l'extrait protéique et 2 ml de réactif de Bradford. Après 5 mn on mesure l'absorbance à 595 nm. Tous les traitements statistiques et la gestion des données de l'ensemble des résultats quantitatives obtenus ont été réalisés au moyen des logiciels: Microsoft STATISTICA 5.1 (1997) et Microsoft Excel (2003).

L'électrophorèse des protéines solubles est effectuée sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes [12]. Il est utilisé deux gels superposés de concentration et de pH différents. Le gel de concentration (T= 5%, pH= 6.8), tandis que le gel séparation (T= 12.5%, pH= 8.8). La polymérisation est déclenchée avec du persulfate et du tétraméthyl éthylène diamine (TEMED).

Grâce aux protéines marqueurs utilisées, il est possible de déterminer le poids moléculaire de chaque fraction protéique. La droite de calibration a été établie selon le modèle de FERGUSSON $\log (PM) = a + (b.Rf)$ avec Rf étant la mobilité relative de chaque fraction protéique, calculée de la manière suivante [13]:

$$RF = \text{La distance parcourue par la fraction} / \text{distance parcourue par le front}$$

- Calcul du taux du polymorphisme: Pour chaque traitement, on calcule le pourcentage de similarité des profils protéiques des organes par rapport aux témoins, par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage (\%)} \text{ de polymorphisme} = N/N+N'$$

N = nombre de bandes commune entre les deux organes

N' = nombre de bandes non communes entre les deux organes.

2.- Résultats

2.1.- Teneur en protéines solubles des différents organes de la plante sous le traitement salin au NaCl

Une augmentation de la teneur en protéines solubles dans les feuilles est observée (fig.1) jusqu'à 140,26% pour les plantes stressées à 400 meq, par rapport aux feuilles témoins, arrosées

à la solution nutritive; par contre pour les feuilles des plantes stressées à 800 meq, les teneurs en protéines solubles sont proches de celles du témoin (5.15 pour 4.47 mg.g⁻¹ de PF).

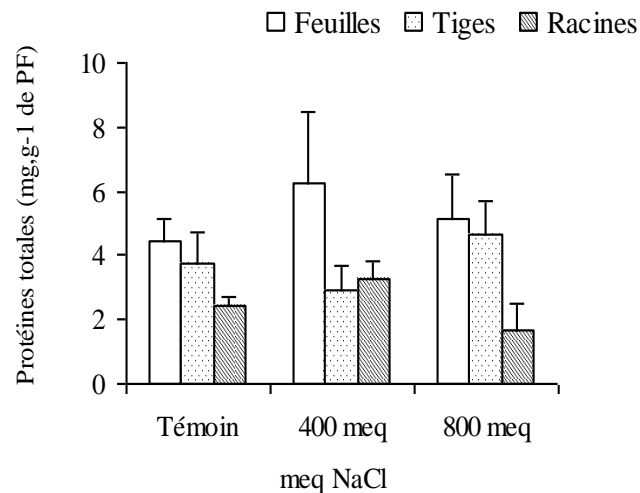


Figure 1.- Teneurs en protéines solubles des différents organes des plantes d'*Atriplex halimus* L. âgées de 150 jours sous stress au NaCl

Dans les tiges, les protéines solubles baissent de teneur sous le traitement à 400 meq de NaCl comparativement aux témoins (2.92 contre 3.77 mg.g⁻¹ de PF) puis augmentent de nouveau sous le traitement à 800 meq de NaCl; cette augmentation des protéines représente un taux de 23.07% comparativement à la teneur en protéines solubles enregistrée chez les tiges des plantes arrosées à la solution nutritive (3.77 pour 4.64 mg.g⁻¹ de PF). Il faut remarquer que les protéines des tiges des plantes stressées à 800 meq de NaCl ne varient pas beaucoup par rapport à celles des feuilles des plantes témoins (4.64 pour 4.47 mg.g⁻¹ de PF).

Dans les racines, les teneurs en protéines restent basses sous le traitement à 800 meq de NaCl et sous arrosage à la solution nutritive lorsqu'elles sont comparées aux autres parties de la plante.

Lorsque les plantes sont alimentées à 400 meq de NaCl, les protéines solubles augmentent sensiblement dans les racines sans différences importantes avec les racines des plantes soit traitées au NaCl ou sans traitement.

Les variations des teneurs en protéines solubles décrites sont analysées statistiquement à l'aide du test de Newman - Keuls (à P=5%) (tab. I).

Tableau I.- Test statistique de signification de Newman - Keuls (à P=5%) des teneurs en protéines solubles des différents organes des plantes d'*Atriplex halimus* L. âgées de 150 jours stressées au NaCl (*: significativement inférieures, **: significativement supérieures, NS: non significatif)

	Témoin	400 meq	800 meq
Feuilles	4.47 ± 1.02	6.27 ± 2.17 **	5.15 ± 1.39 NS
Tiges	3.77 ± 0.94 NS	2.92 ± 0.75 NS *	4.64 ± 1.02 NS NS
Racines	2.42 ± 0.29 *	3.24 ± 0.54 NS *	1.69 ± 0.79 NS *

L'effet traitement en sel, n'influe pas sur les teneurs en protéines solubles quelque soit

l'organe, excepte les feuilles des plantes stressées à 400 meq. En effet, au niveau de ces dernières, les teneurs en protéines sont significativement élevées comparant à celles des feuilles témoins.

Concernant l'effet organe, l'analyse statistique révèle que les teneurs en protéines solubles des racines des plantes témoins et celles alimentées à 800 meq, restent significativement inférieures par rapport aux feuilles et aucune différence significative n'apparaît dans les tiges par rapport aux feuilles.

Le traitement à 400 meq de NaCl agit significativement sur les protéines solubles au niveau des tiges et des racines puisque les teneurs donnent des valeurs remarquablement basses par rapport à celles des feuilles sous le même traitement.

2.3.- Electrophorèse des protéines des organes de la plante *Atriplex halimus* L.

D'une manière générale, les profils protéiques, illustrés sur la figure 2, des organes (feuilles, tiges et racines), des plantes soumises aux stress salin, présentent un nombre important de bandes, bien séparées, ces profils varient selon l'organe et le traitement.

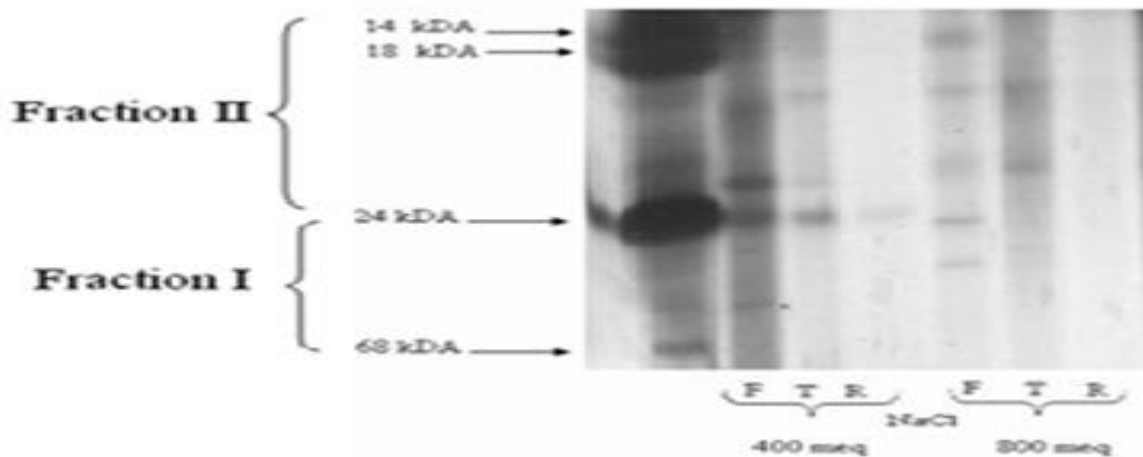


Figure 2.- Profils protéiques des extraits de feuilles (F), tiges (T) et racines (R) des plantes d'*Atriplex halimus* L., soumises à un régime salin pendant 9 jours.

2.3.1.- Polymorphisme protéique des organes de la plante sous traitement salin au NaCl

Le profil protéique des organes des plantes traitées à la salinité au NaCl (fig. 3) montre que 21 bandes protéiques sont identifiées pour l'ensemble des plantes. Cet effectif se répartit pour les plantes stressées à 400 meq avec 12 bandes respectivement distribuées pour les feuilles avec 6 bandes, 5 pour les tiges et 1 bande pour les racines. Sous le traitement à 800 meq, les observations indiquent la présence de 9 bandes protéiques réparties sur 5 dans l'extrait de protéines foliaires, 3 bandes protéiques pour les tiges et seulement une bande pour les racines.

Dans les différents organes des plantes non stressées, aucune protéine à PM élevée n'apparaît dans la fraction I; lorsque les plantes sont stressées à la salinité, les protéines s'expriment dans cette fraction seulement pour les feuilles des plantes soumises à 400 meq de NaCl avec l'apparition d'une nouvelle bande polymorphe de 56 kDa. Dès que la concentration en NaCl double, deux bandes protéiques polymorphes de 40 et 46 kDa sont observées à partir de l'extrait de protéines des feuilles alors qu'une seule bande de 43 kDa est enregistrée pour les tiges.

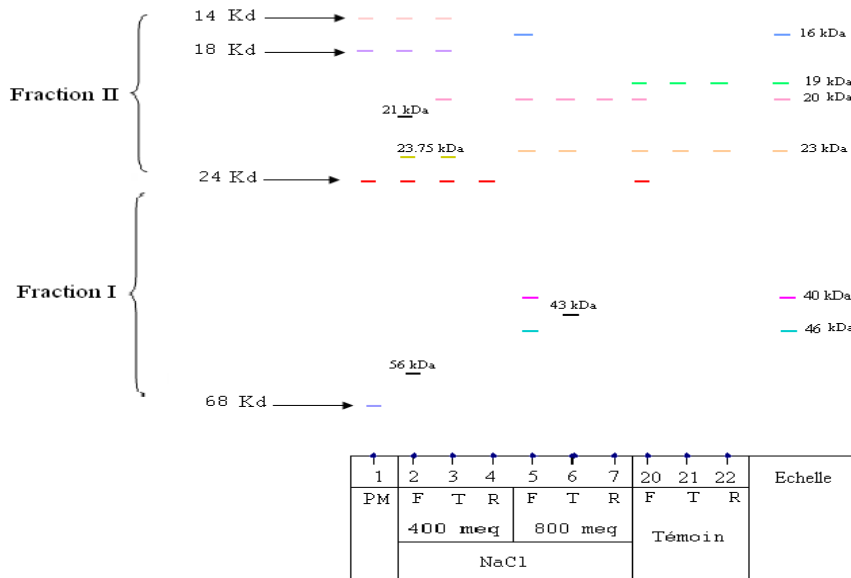


Figure 3.- Protéinogramme des différentes bandes protéiques séparées sur gel SDS- PAGE, à partir d'extrait des feuilles, des tiges et des racines des plantes *Atriplex halimus* L. âgées de 150 jours après sous traitement au NaCl

Pour les plantes témoins, toutes les bandes protéiques de faible PM sont localisées dans la fraction II. Dans ce cas, seulement deux bandes polymorphes apparaissent de PM respectifs de 20 et 24 kDa dans les extraits protéiques des feuilles. Il faut remarquer que ces deux bandes sont absentes dans les extraits protéiques à partir des tiges et des racines.

Le profil protéique des feuilles témoins dans la fraction II regroupe quatre protéines, par contre les feuilles des plantes stressées à 400 meq, cinq nouvelles bandes protéiques sont observées, présentant dans l'ensemble du profil protéique un taux de polymorphisme très élevé (125%) par rapport aux feuilles témoins. A 800 meq, quatre bandes polymorphes apparaissent avec un taux de polymorphisme égal à 75%, dont deux dans la fraction II. Par contre les bandes protéiques de 19 et 23 kDa sont présentes dans les profils protéiques des feuilles, des tiges et des racines.

Dans les extraits protéiques des tiges des plantes traitées à 400 meq, le nombre de bandes protéiques est deux fois plus présent que pour les mêmes organes des plantes témoins. Selon cette distribution des bandes, les tiges des plantes stressées à cette concentration présentent un polymorphisme protéique très élevé de 250 % (5 bandes) comparés au témoin (2 bandes).

Au contraire sous le traitement à 800 meq, seulement une nouvelle bande polymorphe de PM 20 kDa s'illustre dans la fraction II dans les profils protéiques des tiges et des racines par rapport aux mêmes organes des plantes témoins.

En tenant compte de chaque traitement, le tableau 2 montre les variations des taux de polymorphismes établis selon les organes de la plante. En effet, les taux de polymorphismes les plus importants sont obtenus pour les feuilles des plantes recevant le traitement salin à 800 meq de NaCl (60%) et à 400 meq (33.33%) et pour les témoins (50%).

De même, le taux de similarité calculé (tab. II), par rapport au témoin pour chaque organe, indique que sous l'effet traitement salin à 800 meq de NaCl, ses valeurs sont 3 fois plus élevées pour les feuilles comparativement aux mêmes organes des plantes recevant la salinité à 400 meq de NaCl alors que pour les tiges ce taux arrive jusqu'à 33.33%.

Tableau II.- Taux de polymorphisme des bandes protéiques des organes des plantes d'*Atriplex halimus* L. conduites sous stress au NaCl

Organes	Pourcentage (%) de polymorphisme		
	Témoin	400 meq	800 meq
Feuilles	50%	33.33 %	60 %
Tiges	0%	20 %	33.33 %
racines	0%	0%	0%

3.- Discussion

Des résultats obtenus, il est possible de conclure que, l'accumulation protéique aux niveaux des différents organes de la plante prend la même allure pour les traitements salins. En effet, plusieurs travaux rapportent que le sel provoque généralement des changements métaboliques identiques à ceux observés sous stress hydrique [14].

Selon de nombreux auteurs, ces stress ont pour conséquence de réduire la photosynthèse ainsi que l'activité photochimique [15, 16, 17, 18], en produisant au niveau des résidus protéiques différentes modifications tel que la désamination, l'isomérisation et l'oxydation [19]. L'effet du sel se manifeste soit par une diminution des teneurs foliaires en protéines solubles [20], due à un ralentissement de la synthèse protéique et inhibition de l'activité enzymatique [21] ou par leurs augmentations [22], comme c'est le cas pour les feuilles des différentes plantes sous régime salin.

Les changements les plus importants s'effectuent aux niveaux des feuilles, cela s'accorde avec les résultats obtenus par DEEPIKA et ANIL [23], affirmant que les feuilles sont les organes les plus sensibles aux changements qui se produisent au niveau du métabolisme primaire, due en grande partie à la réponse générale aux stress environnementaux, tels que les stress hydriques et salins. Ces stress provoquent l'augmentation du taux des protéines, généralement due à une surexpression des enzymes impliquées dans la réparation des protéines pendant ces deux stress [19, 22]. La membrane thylakoïdienne des feuilles est visiblement, la plus sensible aux stress abiotiques, provoquant chez la plante des changements irréversibles des enzymes, des protéines et surtout des organites cellulaires entraînant la désorganisation de l'appareil photosynthétique [24].

Des protéines de sécheresses, ont été signalées dans des plantes soumises à un déficit hydrique analogues aux HPS [25], par exemple une protéine de 60 kDa dans les feuilles d'orge [26] ainsi qu'une osmotine de 26 kDa synthétisée lors d'un stress salin chez les cellules de tabac [2]. Un autre peptide de masse moléculaire 50 kDa qui est immunologiquement liée à l'osmotine de tabac a été détectée dans les cellules d'*Atriplex nummularia*. Cette protéine a été constitutivement exprimée dans les cellules de celle-ci lors d'un traitement au NaCl. Une prédominante osmotine de 24 kDa a été également trouvée dans des milieux de culture après la croissance des cellules [27].

La recherche de marqueurs de contraintes, élargie aux protéines, montre par électrophorèse, l'apparition des bandes correspondant aux protéines de stress (10 et 35 kDa) dans le mil [28]. Le sel induit la synthèse de 5 nouvelles protéines de 20 à 40 kDa chez les feuilles de l'orge [10] contrairement aux cellules du tabac où le taux de protéines a légèrement diminué lors d'un traitement au NaCl, par contre chez *Atriplex nummularia* un petit polypeptide de 24 kDa est synthétisé, probablement liée à l'osmotine dégradées.

Conclusion

La réponse protéique des plantes d'*Atriplex halimus* L. vis à vis d'un régime salin varie selon l'organe et l'intensité du stress. Les analyses des protéines solubles à l'aide de la méthode de BRADFORD montrent que d'une manière générale, l'accumulation des protéines solubles s'effectue principalement aux niveaux des feuilles sous les différents traitements salins. Les racines présentent toujours des teneurs en protéines solubles remarquablement inférieures à celles des parties aériennes.

Les analyses des protéines solubles par électrophorèse montrent que les feuilles présentent toujours les profils protéiques les plus riches en bandes protéiques avec un taux de polymorphisme supérieur à 20%, selon le traitement appliqué:

Les feuilles des plantes témoins, traitées avec 100% de la solution nutritives présentent un taux de polymorphisme de 50% contrairement aux tiges et aux racines où il est nul. Le profil protéique de l'ensemble des organes, sous régime salin au NaCl est riche en bandes protéiques et présente le plus de bande protéiques polymorphe par rapport aux témoins.

Pour les plantes traitées par la salinité NaCl + CaCl₂, le nombre de bandes protéique des feuilles diminue d'une manière croissante avec l'augmentation de la concentration de la solution d'arrosage.

Le polymorphisme protéique s'exprime seulement aux niveaux des feuilles, particulièrement à 800 meq. Plusieurs bandes polymorphes de PM= 56 kDa, 46 kDa, 43 kDa, 40 kDa, 23.72 kDa et 21 kDa apparaissent dans les différents profils protéiques des plantes stressées à la salinité aux NaCl et NaCl + CaCl₂.

Références bibliographiques

- [1].- Hartung W., Radin J. W. and Hendrix D. L., 1988.- Abscisic acid movement into the apoplastic solution of water-stressed cotton leaves. *Plant Physiol*, 86: 908-931.
- [2].- Singh N. K., Handa A. K., Hasegawa P. M. and Bressan R. A., 1987.- Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol*. 79: 126-137.
- [3].- Okushima Y., Koizumi N., Kusano T. and Sano H., 2000.- Secreted proteins of tobacco cultured bBY2 cell: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol*. 49: 479-488.
- [4].- Zhang J., Nguyen H. T. and Blum A., 1999.- Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plant. *Journal of exp. Bot.*, 50, 322 p.
- [5].- Di Martino C., Delfino S., Pizzuto R., Loreto F. and Fuggi A., 2003.- Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytologist*. 158: 455-463.
- [6].- Shen Y. G., Zhang W. K., Yan D. Q., Du B. X., Zhang J. S., Liu Q., Chenshiu S. H. and Bleeker A. B., 2001.- Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci stke*, 22 p.
- [7].- Singh N. K., Handa A. K., Hasegawa P. M. and Bressan R. A., 1987.- Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol*. 79: 126-137.
- [8].- Cairney J., Chang S., Puryear J. D., Dias M., Funkhouser E. A. and Newton R. J., 1995.- Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum*, 97 :139-148.
- [9].- Zerrad W., Hillali S., Mataoui B., Elantri S. et Hmyene A., 2006.- Etude comparative des

mécanismes biochimiques et moléculaire de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. Congrès International de Biochimie.

[10].- Ramagopal S., 1987.- Salinity stress induced tissue. Specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiol.* 84: 324-331.

[11].- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 72: 248-254.

[12].- Laemmli U. K., 1970.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227: 680-685.

[13].- Billard J. P. et Binet P., 1975.- Ecophysiologie des *Atriplex* des milieux sableux littoraux. *Soc Bot France*, 122: 51-64.

[14].- Munns R., 2002.- Comparative physiology of salt and water stress plant. *Cell and Environment.* 25: 239-250.

[15].- Eastman P. and Camm E., 1995.- Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree physiology*, 15: 229-235.

[16].- Orcutt D. M. and Nilsen E. T., 2000.- Physiology of plants under stress. John Wiley and Sons, New York, 683 p.

[17].- Godde D., 1999.- Adaptation of the photosynthetic apparatus to stress condition. In: Lerner H. R eds. *Plant response to environmental stresses, from phytohormones to genome reorganisation.* Ed. Marcel Dekker 499 p.

[18].- Ortega J. L., Temples S. J., Bagga S., Ghoshroy S. and Sengupta G., 2004.- biochemical and molecular characterization of transgenic *Lotus japonicus* plants constitutively over-expressing a cytosolic glutamine synthetase gene. *Planta*, 219: 807-818.

[19].- Greelman R. A. and Mullet J. E., 1997.- Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant physiology*, 48: 355-381.

[20].- Bekki A., Trinchant J. C., Rigaud J., 1987.- Nitrogen fixation by Medicago nodules and bacteroids under sodium chlorid stress. *Physiol plant*, 71: 61-67.

[21].- Blaha G., Stelzl U., Spahn C. M. T., Agrawal R. K., Frank J. and Nierhaus H. K., 2000.- Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol*, 317: 292-309.

[22].- Khales A. et Baaziz M., 2006.- Etude des peroxydases d'écotypes d'*Opuntia ficus indica* L. en relation avec le développement dans les conditions de stress salin. Congrès international de Biochimie.

[23].- Deepika M. and Anil G., 1999.- Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stress. *Plant Sci*, 146: 41-51.

[24].- Chakhparonian M., 1995. Développement d'un système biologique de surveillance de la pollution atmosphérique: Etude sur des populations d'*Arabidopsis thaliana* sous conditions contrôlées. Uni de Lausanne, Fac des Sci., 52 p.

[25].- Mazliak P., 1995.- Physiologie des stress. Ed. Hermann, 432 p.

[26].- Dasgupta AND Bewle Y., 1984.- Variation in proteins synthesis in different regions of green leaves of barley seedlings and effects of composed water stress. *J. Exp. Bot*, 35: 1450-1459.

[27].- Casas A. M. Nelson D. E. Raghothama K. G. D'urzo M. P. Shing N. K. Bressan R. A and Hasegawa P.M., 1992.- Expression of osmotin-like genes in halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant physiol*, 99: 329-337.

[28].- Moulineau C., 1994.- Le stress hydrique chez le *Pennisetum glaucum*: caractérisation et recherche des marqueurs moléculaire. Thèse doctorat. Uni de Montpellier, 24 p.