

EFFET DU STRESS SALIN SUR LA VARIATION D'ISOENZYMES D'ESTERASES DE DEUX GENOTYPES CONTRASTES DE MEDICAGO

AMOURI Adel Amar

Département de Biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Université d'Oran I Ahmed Ben Bella, Oran, Algérie

E-mail: amouri.adel@univ-oran.dz, amouriaa@yahoo.fr

Résumé.- L'activité des estérases qui est liée au stade physiologique et métabolique de la cellule des plantes, peut être affectée par les facteurs environnementaux tels que le stress salin. La présente étude porte sur l'électrophorèse native des isoenzymes d'estérases, chez deux génotypes de deux espèces différentes du genre *Medicago*, l'une tolérante de l'espèce *M. truncatula* Gaertn, et l'autre sensible de l'espèce *M. polymorpha* L. L'étude de la synthèse des isoenzymes d'estérases durant la germination des graines sous différentes concentrations de salinité 0, 68, 102 et 137 mM, a montré des variations quantitatives et qualitatives spécifiques dans la synthèse de ces isoenzymes, entre les deux génotypes contrastés. Ce polymorphisme biochimique d'isoenzymes d'estérases, peut être expliqué par un polymorphisme génétique des gènes impliqués dans la tolérance au stress salin chez *Medicago*.

Mots clés: *Medicago*, stress salin, isoenzymes, estérase, Algérie.

EFFECT OF SALT STRESS ON VARIATION OF ESTERASE ISOENZYMES OF TWO CONTRASTING GENOTYPES OF *MEDICAGO*

Abstract.- The activity of the esterases which is related to the physiological and metabolic stage of the plant cell, can be affected by the environmental factors such as the salt stress. Our study was carried on the native electrophoresis of the esterases isoenzymes, on two ecotypes from two different species of *Medicago*, the tolerant from *M. truncatula* Gaertn and the sensitive one from *M. polymorpha* L. The study of the synthesis of esterases isozymes during germination of seeds under different salt concentration of salinity 0, 68, 102 and 137 mM, showed a specific quantitative and qualitative variations of isoenzymes synthesis, between the two contrasting. This biochemical polymorphism of esterases isoenzymes, can be explained by the genetic polymorphism of genes involved in salt stress tolerance in *Medicago*.

Key words: *Medicago*, salt stress, germination, isoenzymes, esterase, Algeria

Introduction

Les espèces annuelles du genre *Medicago* jouent un rôle important dans l'amélioration de la production fourragère. Elles sont souvent utilisées dans les systèmes de rotation, céréales-luzernes, se régénèrent par auto-semis et permettent le maintien de la fertilité du sol grâce à leur capacité fixatrice d'azote atmosphérique. Le stress salin constitue l'un des facteurs limitant de la productivité et la distribution de ces plantes dans les zones arides et semi-arides. Les estérases (E.C.3.1.1.2) appartiennent au groupe des hydrolases; leur activité est liée au stade physiologique et métabolique de la cellule et peut-être affectée par les facteurs environnementaux tels que la température, le stress hydrique, le stress salin et les agents polluants. La salinité qui est causée par le stress hydrique altère l'expression des gènes, diminue la synthèse des protéines et/ou augmente l'hydrolyse des

protéines, ce qui réduit la croissance de la plante [1]. Les profils des isoenzymes d'estérase chez les plantes supérieures diffèrent entre les tissus et les différents stades physiologiques [2].

Le présent travail, a pour but de déterminer comment le stress salin peut influencer sur les changements des profils de synthèse des isoenzymes d'estérase chez deux génotypes appartenant à deux espèces annuelles du genre *Medicago*, l'un jugé tolérant chez *M. truncatula* Gaertn et l'autre sensible chez *M. polymorpha* L. [3].

1.- Matériels et Méthodes

1.1.- Condition de germination des graines

Un lot de graines de deux écotypes appartenant au genre *Medicago*, Tru 42 et Pol 248, fournis par l'école nationale agronomique d'El Harrach, Alger, sont désinfectées, scarifiées puis mises à germer à l'obscurité durant dix jours en boîte de Pétri fermées, et tapissées avec du papier filtre, imbibées avec le milieu correspondant, dans une étuve à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Les graines sont imbibées avec des solutions de différentes concentrations de NaCl (0, 68, 102 et 137 mM), qui correspondent aux traitements (T_0 , T_1 , T_2 et T_3), respectivement.

1.2.- Préparation des extraits isoenzymatiques d'estérase

L'extraction des isoenzymes d'estérase à partir des jeunes plants, est menée à froid dans un mortier en présence de sable et de tampon Tris-KCl à pH = 7. Les extraits sont soumis ensuite à une centrifugation à froid à 4°C pendant 20 mn, à une vitesse de 13000 tours/ mn. La conservation des extraits a lieu dans un cryoconservateur contenant de l'azote liquide [4].

1.3.- Électrophorèse native sur gel de polyacrylamide

La migration s'effectue sur un gel continu de polyacrylamide à 8%, dans du tampon Tris Borate EDTA à pH = 8.3. Le tampon cuve est constitué de tampon gel dilué 10 fois. La migration se déroule à 5°C pendant 6 h sous une intensité constante de 30 mA et une tension de 150 V. La révélation s'effectue dans une solution contenant du phosphate disodique 0.1M à pH = 6.2, après l'ajout d'un substrat α naphtyl butyrate 1%, mélangé avec de l'acétone et du Fast Blue RR salt. Après révélation les gels sont séchés et conservés [5].

2.- Résultats et discussion

Les figures 1 et 2, représentent les profils du système estérase (EST) chez l'écotype jugé tolérant Tru 42 et l'écotype moins tolérant Pol 248 en condition témoin (T_0) et sous différentes concentrations de chlorure de sodium T_1 , T_2 et T_3 . Afin de faciliter l'interprétation des profils, chaque bande représente un isozyme qui est identifiée par son R_f , ainsi que son intensité qui représente le niveau d'expression de cet isozyme.

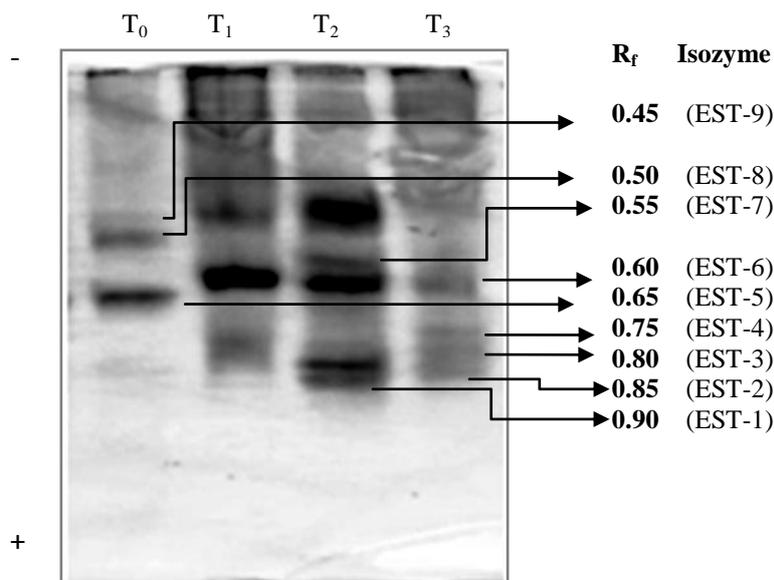


Figure 1.- Profil électrophorétique d'isoenzymes d'estérase chez le génotype tolérant Tru 42 de *M. truncatula* Gaertn

L'analyse du profil isoenzymatique chez le génotype tolérant Tru 42 (fig. 1), montre qu'en conditions témoins, il y a présence de trois isozymes avec des expressions différentes selon l'intensité des bandes, de la moins forte (EST-9), moyennement forte (EST-8) à la plus intense (EST-5). Au traitement T₁, il existe trois isozymes dont deux sont de faible expression (EST-9 et EST-4) et deux autres avec une forte synthèse (EST-6 et EST-4), nouvellement apparus par rapport au témoin. Au traitement T₂, six bandes d'isozyme sont identifiés, trois d'entre eux sont de fortes expressions, il s'agit des isozymes (EST-9, EST-6) et un nouvel isozyme (EST-4). Les trois autres nouveaux isozymes de faibles synthèses sont (EST-7, EST-3 et EST-1). Au traitement T₃, cinq isozymes de très faibles expressions ont été observées (EST-9, EST-6, EST-4, EST-3 et EST-2), avec la disparition de deux isozymes (EST-8 et EST-5) ce qui donne l'apparition de quatre isozymes par rapport au témoin. En général et par rapport au témoin, il y a disparition de deux isozymes (EST-8 et EST-5) et apparition de deux nouveaux isozymes (EST-7 et EST-1) seulement au traitement T₂. De plus il y a une augmentation de la synthèse de l'isozyme (EST-9) par rapport au traitement T₁. L'examen du profil du même système enzymatique du génotype le moins tolérant Pol 248 (fig. 2), montre qu'en condition témoins, il existe un seul isozyme (EST-6) avec une expression moyenne. Au traitement T₁, deux isozymes sont présents, l'une à forte expression (EST-6) et un nouvel isozyme (EST-5) de faible expression. Au traitement T₂, six bandes d'isozymes sont observés, trois d'entre eux sont de fortes intensités (EST-1, EST-2 et EST-6), un isozyme moyennement exprimé (EST-5) et deux autres isoenzymes de faible expression (EST-3 et EST-4). Donc cinq nouveaux isozymes apparus par rapport au traitement T₂ par rapport au témoin. Au traitement T₃, cinq bandes d'isozymes sont notées avec une très faible synthèse (EST-1, EST-2, EST-4, EST-5 et EST-6).

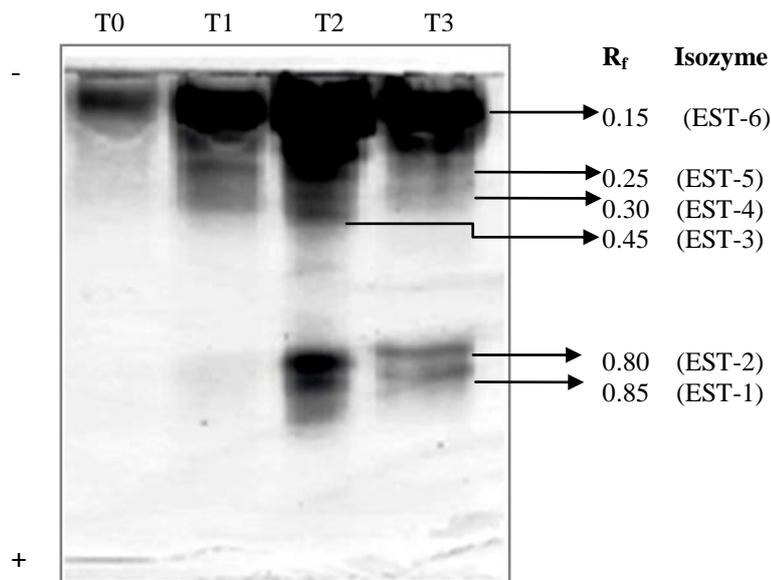


Figure 2.-Profil électrophorétique d'isoenzymes d'estérases chez le génotype sensible Pol 248 de *M. polymorpha* L.

En résumé et par rapport au témoin, il y a apparition de cinq nouvelles isoenzymes avec une forte expression au traitement T₂. La comparaison des deux profils d'isoenzymes d'estérase entre les deux génotypes, montre qu'il y a un changement dans l'expression de ces isoenzymes et ceci par l'apparition ou la disparition des bandes, cependant l'augmentation de leur intensité, représente l'augmentation de l'activité enzymatique qui est influencée par le stress salin [6].

Les profils électrophorétiques des isoenzymes d'estérases ont montré des différences dans le nombre et l'intensité des bandes entre les échantillons témoins et traités chez les deux génotypes étudiés. En conditions témoin, les profils sont caractérisés par l'apparition de trois formes d'isoenzymes d'estérases (EST-5, EST-8 et EST-9) chez le génotype tolérant de *M. truncatula*, et une seule forme d'isozyme (EST-6) chez le génotype moins tolérant de *M. polymorpha*. À une concentration de 68 mM de chlorure de sodium (T₁), le génotype tolérant exprime un nouvel isozyme (EST-6), tandis que le génotype sensible exprime un nouvel isozyme (EST-5), donc une seule variation qualitative pour les deux génotypes, ces nouveaux isoenzymes jouent un rôle important dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif, causé par le stress salin [7]. La concentration de 102 mM (T₂) a causé une augmentation dans la synthèse de nouveaux isoenzymes d'estérase chez les deux génotypes par rapport au témoin, mais cette augmentation est plus élevée chez le génotype moins tolérant de *M. polymorpha* avec la synthèse de quatre nouveaux isoenzymes (EST-1, EST-2, EST-3 et EST-4), probablement pour mieux tolérer au stress salin, alors que pour le génotype tolérant seulement trois nouveaux isoenzymes (EST-1, EST-2 et EST-7). Cette même analyse a été détectée chez le Maïs en réponse à la salinité [7]. Les isoenzymes nouvellement synthétisés sont probablement des isoenzymes de stress appartenant à une famille d'enzymes permettant un maintien à un niveau normal la physiologie des cellules ainsi que leur métabolisme biochimique [8]. A une concentration élevée en sel qui est de 137 mM (T₃), les profils montrent clairement des variations quantitatives et qualitatives des isoenzymes d'estérase spécifique pour chaque génotype. Chez le génotype le moins tolérant, il y a surtout des variations quantitatives par la diminution de l'intensité des

bandes d'isozymes et par conséquent, une diminution de l'activité enzymatique, alors que chez le génotype tolérant de *M. truncatula*, les variations qualitatives sont beaucoup plus prononcées et ceci par la disparition et l'apparition de certaines formes isoenzymatiques; ces isoformes d'estérases sont très variables en fonction des espèces et des écotypes et beaucoup plus en fonction des stades de développement [9]. Ainsi le changement dans l'expression de ces isozymes suggère que les gènes impliqués dans la synthèse de certaines formes de ces isoenzymes sont activées et régulées d'une façon différentielle sous les conditions de stress hydrique [10]. L'expression de ces gènes, est influencée par différents facteurs environnementaux tel que les stress salin [11]. D'ailleurs la tolérance au stress chez les plantes, a été considérée comme un trait multigénique qui dépend de l'interaction entre les différents gènes [12].

Conclusion

L'étude de la synthèse des isoenzymes d'estérases au cours du processus germinatif des graines de *Medicago*, en condition témoin et durant le stress salin, a permis de mettre en évidence des variations quantitatives qui sont beaucoup plus prononcées chez le génotype moins tolérant Pol 248 de l'espèce *M. polymorpha* par rapport au génotype tolérant Tru 42 de l'espèce *M. truncatula*, ce dernier, présente des variations qualitatives importantes. L'expression différentielle des gènes responsables de la synthèse des isoenzymes d'estérases, pourrait bien expliquer ces résultats. En utilisant les marqueurs moléculaires, il est possible de localiser les gènes impliqués dans la tolérance au stress salin chez *Medicago*, afin de sélectionner les génotypes les plus tolérants en vue de leur utilisation agricole. Ceci permettra d'augmenter la productivité fourragère dans les zones arides et semi arides.

Remerciements

Ma grande gratitude à Professeure Fyad Lamèche F-Z pour l'élaboration de la technique d'électrophorèse au sein de son laboratoire à l'université d'Oran 1. Je remercie Professeur A. Abdelguerfi de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger pour l'apport du matériel végétal nécessaire pour cette étude.

Références bibliographiques

- [1].- Cherian S. and Reddy M. P., 2003.- Evaluation of NaCl tolerance in the callus cultures of Suaedo nudiflova Moq. *Biologia Plantarum*, 46: 139-198.
- [2].- Tanksley S. D. AND Rick C. M., 1980.- Genetics of esterases in species of lycopersicon. *Theoretical and Applied Genetics*, 26: 209-219.
- [3].- Amouri A. A, Fyad-Lamèche F. Z., 2012.- Comparative analysis of salinity tolerance of the male gametophyte and the sporophyte in *Medicago* at the germination stage. *Acta botanica Malacitana*, 37: 93-102.
- [4].- Iglesias L. H., Lim A. and Simon L. P., 1974.- Isozyme identification of zygotic and nuclear seedlings in citrus. *J. Hered*, 65: 81-84.
- [5].- Posvec, Z. and Griga M., 2000.- Utilization of isozyme polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, 113: 251-258.

- [6].- Hassaein A. M., 1999.- Alteration in protein and esterase pattern of peanut in response to salinity stress. *Biologia plantarum*, 42: 241- 248.
- [7].- Mohamed A. A., 2005.- Two-dimensional electrophoresis of soluble protein and profile of some isozyme isolated from Maize plant in response to NaCl. *Research journal of Agriculture and biological sciences* 1, 1: 38-44.
- [8].- Zhang J.S., Xie C. and Liu F., 1999.- A novel tobacco gene coding for a product similar to bacterial two component regulators. *Chinese Science Bulletin*, 44, 11, 1025 p.
- [9].- Fyad Lameche F. Z., 1999.- Polymorphisme des isoenzymes et des protéines de réserves des graines de population naturelles d'espèces annuelles de *Medicago* en relation avec le système de reproduction. Thèse de doctorat d'état en amélioration des plantes. Université d'Oran Es Senia, Algérie, 194 p.
- [10].- El Tayeb M. A. and Hassaien A. M., 2000.- Germination, seedling growth, some organic solutes and peroxides expression of different *Vicia faba* lines as influenced by water stress. *Acta agronomica hungarica*, 48: 11-20.
- [11].- Foolad M. R., 2004.- Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato. *Plant Cell, tissue and organ culture*, 76: 101-119.
- [12].- Hare P. D., Du Plessis S. and Cress W. A., Van Staden J., 1996.- Stress-induced changes in plant gene expression. *South African Journal of Science*, 92: 431-439.