RECHERCHE *IN SILICO* DES PROTEINES ASSOCIEES A LA TOLERANCE AUX METAUX LOURDS CHEZ LA PLANTE HALOPHILE DU GENRE Atriplex

AMOURI Adel Amar, CHERIF HADRIA Wafaa et BELKHODJA Moulay
Laboratoire de Biotoxicologie Expérimentale de Bio dépollution et de Phyroremédiation, Equipe: Physiologie végétale, Faculté SNV, Département de Biologie, Université d'Oran$_1$
31000 Oran, Algérie
E-mail: amouriaa@yahoo.fr; amouri.adel@univ-oran1.dz

(Received 12 December 2021 - Accepted 9 May 2022)

Résumé.- *La pollution due aux métaux lourds pose un problème environnemental majeur au niveau des sols agricoles et de l'air. En plus de l'approche* in vitro *et / ou* in vivo. *L'approche* in silico, *faisant appel à l'outil bioinformatique, s'avère une alternative afin d'identifier et exploiter rapidement les molécules (gènes et protéines) responsables de la tolérance aux métaux lourds chez les plantes. Ceci permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires en question. L'étude a porté sur une espèce halophile* Atriplex canescens *(Pursh Nutt). Les résultats obtenus via la base de données moléculaire NCBI, a permis d'identifier une famille de protéines associées aux métaux lourds nommée «heavy metal associated protein» chez l'espèce* Atriplex canescnes *(Purch Nutt) qui sont responsables du transport des ions métalliques et à la détoxification. La recherche de similitude de séquence en utilisant l'outil BLAST, a permis d'identifier des similarités de fonction significatives avec des protéines de la même famille, chez différentes plantes comme* Chenopodium quinoa *willd., et les espèces modèles* Arabidopsis thaliana *L. et* Medicago truncatula *Gaertn.*

Mots cles: A. canescnes, *gènes, protéines associées aux métaux lourds,* in silico, *NCBI, BLASTp.*

IN SILICO RESEARCH OF ASSOCIATED PROTEINS WITH HEAVY METAL TOLERANCE IN THE HALOPHILIC PLANT *Atriplex* L.

Abstract.- *Pollution from heavy metals is a major environmental problem for agricultural soils and air. In addition to the* in vitro *and / or* in vivo *approach, the* in silico *approach, using the bioinformatics tools, proves to be an alternative to identify rapidly to exploit the molecules (genes and proteins) responsible for heavy metal tolerance in plants. This allows a better understanding of the molecular mechanisms in question. Our study focused on the halophilic* Atriplex canescens *species. The results obtained via the NCBI molecular database, allowed to identify a family of proteins associated with heavy metals in the species* Atriplex canescnes *(Purch Nutt). This kind of proteins is responsible to metallic ionic transport and detoxification. The search of similarity sequences using the BLAST tool, showed a significant function similarities with others proteins of the same family in different plants such as* Chenopodium quinoa *willd., and the plant models like* Arabidopsis thaliana *L. and* Medicago truncatula *Gaertn.*

Key words: A. canescnes, *genes, heavy metals associated protein, in silico, NCBI, BLASTp.*

Introduction

La pollution de l'environnement constitue depuis les années soixante une préoccupation majeure de nos sociétés modernes, c'est un changement défavorable du milieu naturel en modifiant les composantes physiques, chimiques et/ou biologiques [1,2] principalement les sols agricoles. Elle représente un sérieux problème pour l'environnement à cause des rejets de nombreux produits chimiques dont des éléments métalliques (métaux lourds) rejetés par les industries, l'agriculture et les communautés

urbaines [3]. Cette pollution peut avoir un impact direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes. La toxicité des métaux lourds est intimement liée à leurs propriétés oxydo-réductrices et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, qui possèdent un électron non apparié. Au niveau cellulaire, les principales cibles des molécules ROS sont l'ADN, les phospholipides membranaires, les protéines et les acides aminés [4]. Les plantes possèdent des systèmes de stockage ou de détoxification leur permettant de diminuer les effets néfastes des métaux lourds. Selon les espèces, ces systèmes sont plus ou moins développés, mais, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes sont prépondérants: la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule végétale. Le système antioxydant qui limite les dégâts causés par les ROS et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique [5]. La compréhension des mécanismes de tolérance des plantes à la toxicité due au stress métallique, constitue un apport majeur dans le développent des biomarqueurs. *Atriplex* qui est une plante halophile est présente dans les sols pollués par les métaux lourds, est capable de tolérer des concentrations élevées de cadmium, de zinc et de cuivre [6-8]. Cependant, ces mécanismes de tolérance ne sont pas encore bien connus. L'objectif est l'identification *in silico* des protéines et leurs gènes codant responsable de la tolérance aux métaux lourd chez le genre *Atriplex L*, par l'interrogation des bases de données moléculaires comme (Genbank: NCBI) et la recherche de similitude de séquences avec les molécules trouvées chez les plantes en général et les espèces modèles «*Arabidopsis thaliana* L. et *Medicago truncatula* Gaertn».

1.- Matériel et Méthodes

1.1.- Matériel d'étude

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de:
- L'espèce *Atriplex* (Pursh Nutt), (2n=18),
- Les espèces modèles, la légumineuse *Medicago truncatula* Gaertn. (2n=16) et *Arabidopsis thaliana* L. (2n = 10) car leurs génomes ont été complètement séquencés.
- La base de données moléculaire: Genbank NCBI**: N**ational **C**enter for Biotechnology Information (https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

1.2.- Méthode d'étude

1.2.1.- Identification des protéines liées à la tolérance aux métaux lourds chez *Atriplex canescens*

Les étapes de recherche à suivre sont:
- interroger la base des données NCBI.
- écrire les mots - clefs en Anglais « *Atriplex heavy metal*» dans le moteur de la recherche (fig. 1);
- choisir «All Databases» pour généraliser la recherche;
- cliquer sur «search».

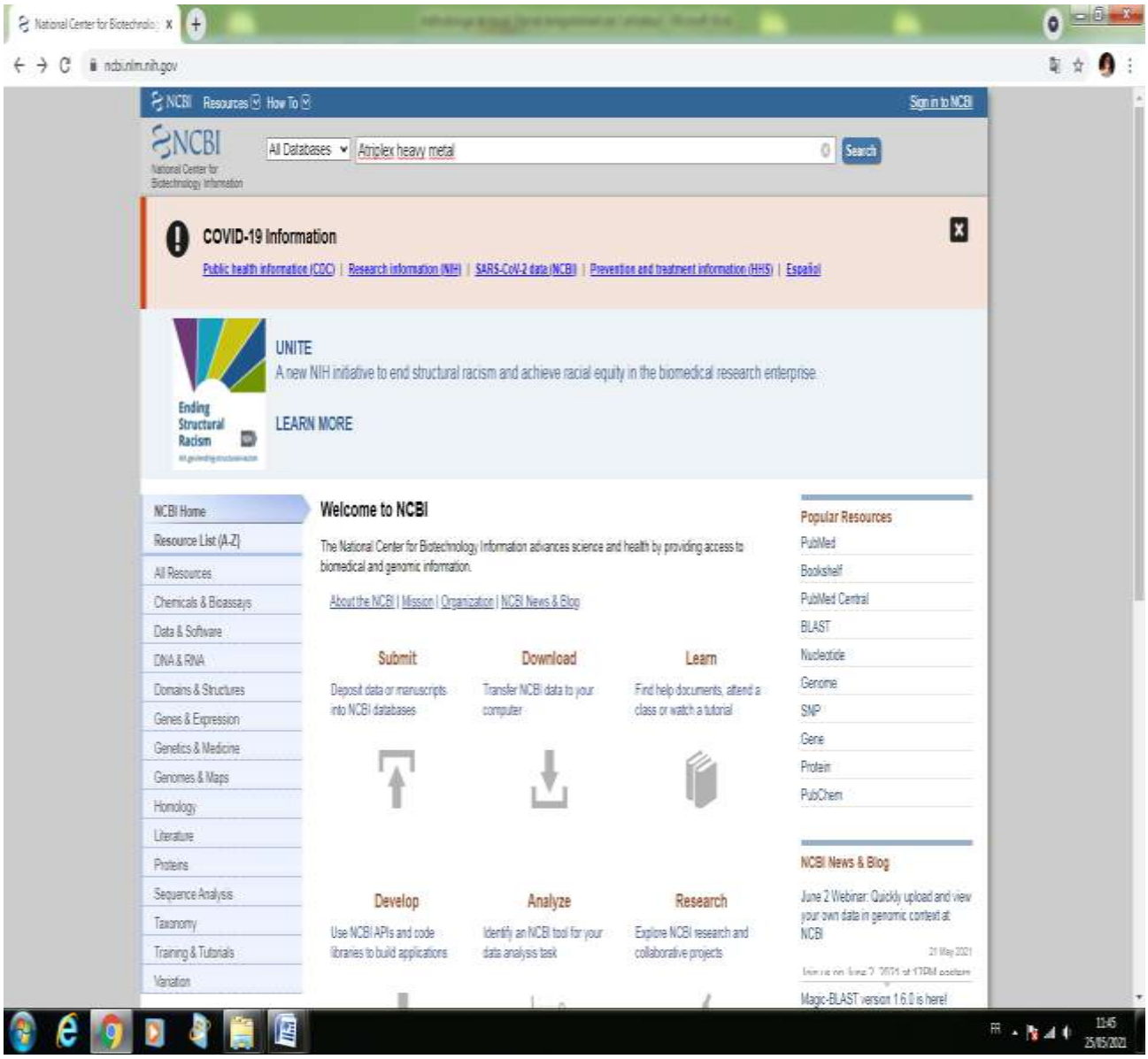

Figure 1.- Interrogation de la base de données NCBI

2.2.- Recherche de similitude de séquence avec la protéine identifiée

- identifier la protéine en relation avec les métaux lourds chez l'*Atriplex;*
- appliquer BLASTp sur la séquence identifiée pour la recherche d'une similitude de séquence protéique avec les plantes utilisées en générale comme organismes cible (fig. 2);
- cliquer sur le bouton BLAST pour analyser les résultats.

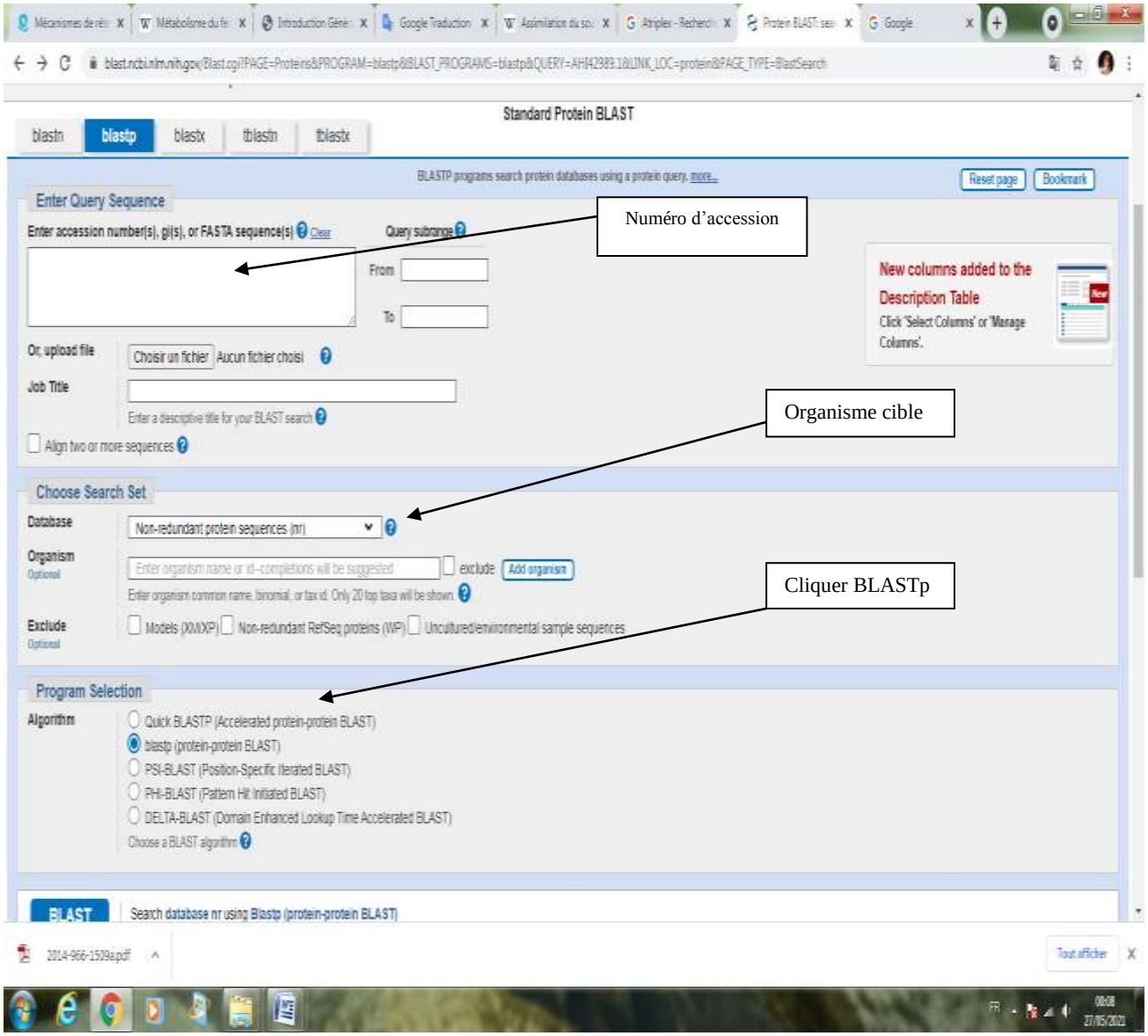

Figure 2.- Interface de l'outil BLAST

2.- Résultats

2.1. - Molécules trouvées en relation avec les métaux lourds chez *Atriplex canescens* (Pursh Nutt)

Les résultats de recherche obtenus dans la base de données NCBI, donnent un ensemble d'informations classées dans des rubriques bien distinctes comme les données bibliographiques (PubMed). Il est retrouvé 8 protéines et 10 séquences nucléotides par contre aucune information n'a été trouvée concernant les gènes (fig. 3). Il a été choisi de travailler sur les protéines; en cliquant sur «proteins».

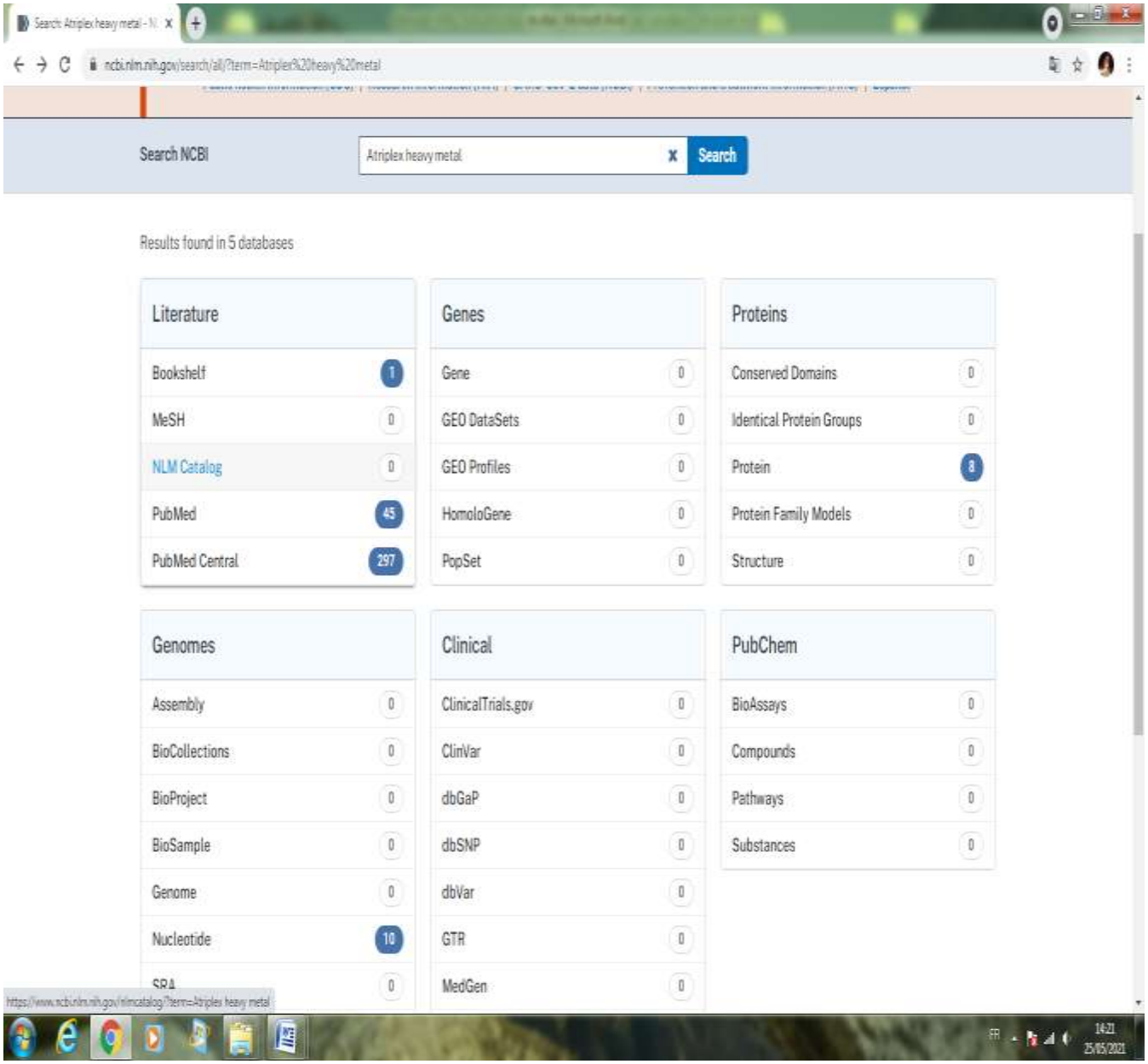

Figure 3.- Résultats de recherche des molécules en relation avec les métaux lourds chez Atriplex

L'interface suivante représente les différentes protéines trouvées (fig. 4). Parmi ces protéines il est choisi le premier «heavy metal associated protein» chez *Atriplex canescnens* qui contient 316 acides aminées.

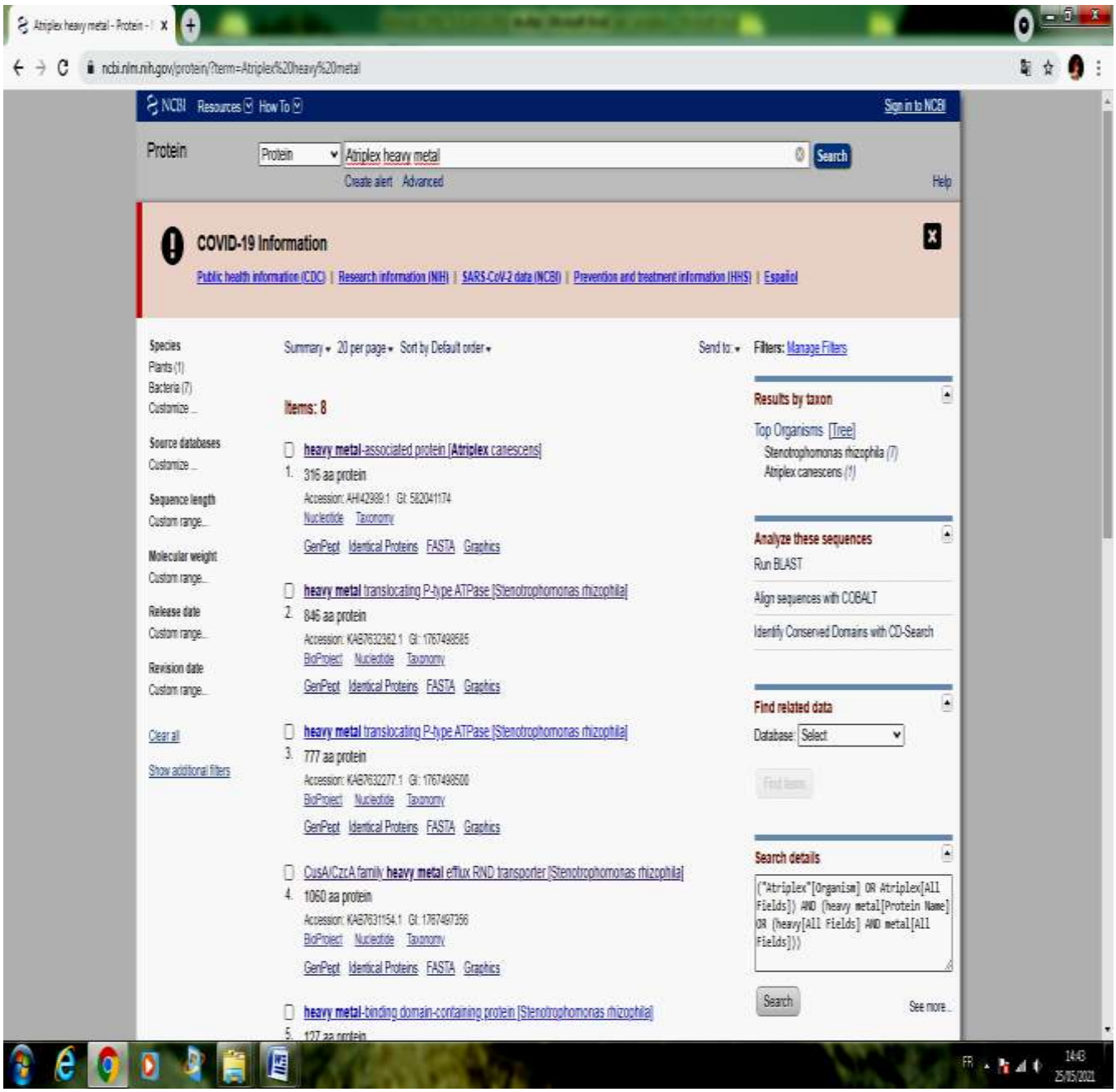

Figure 4.- Liste des protéines en relation avec les métaux lourds chez Atriplex.

2.2.- Résultats du blast sur la similitude entre la séquence requête (heavy metal-associated protein) et celle trouvée chez les plantes

Les résultats obtenus par BLAST donnent un tableau de classement des protéines similaires par ordre de significativité (fig. 6) ;

Parmi les protéines classées, il est sélectionné la première protéine (heavy metal-associated protein 7-Like) appartenant à l'espèce *Chenopodium quinoa* avec 74.30% d'identité et un score de 414 et une E-value estimée à 8 (e^{-144}), valeur hautement significative **(**e: désigne la valeur exponentielle et la E-value ou expected value est calculée en fonction du score brut, de la longueur des protéines alignées, et de la taille de la base de

données, quand la taille d'une base de données augmente, il y aura plus de chances d'observer un hit fortuit).

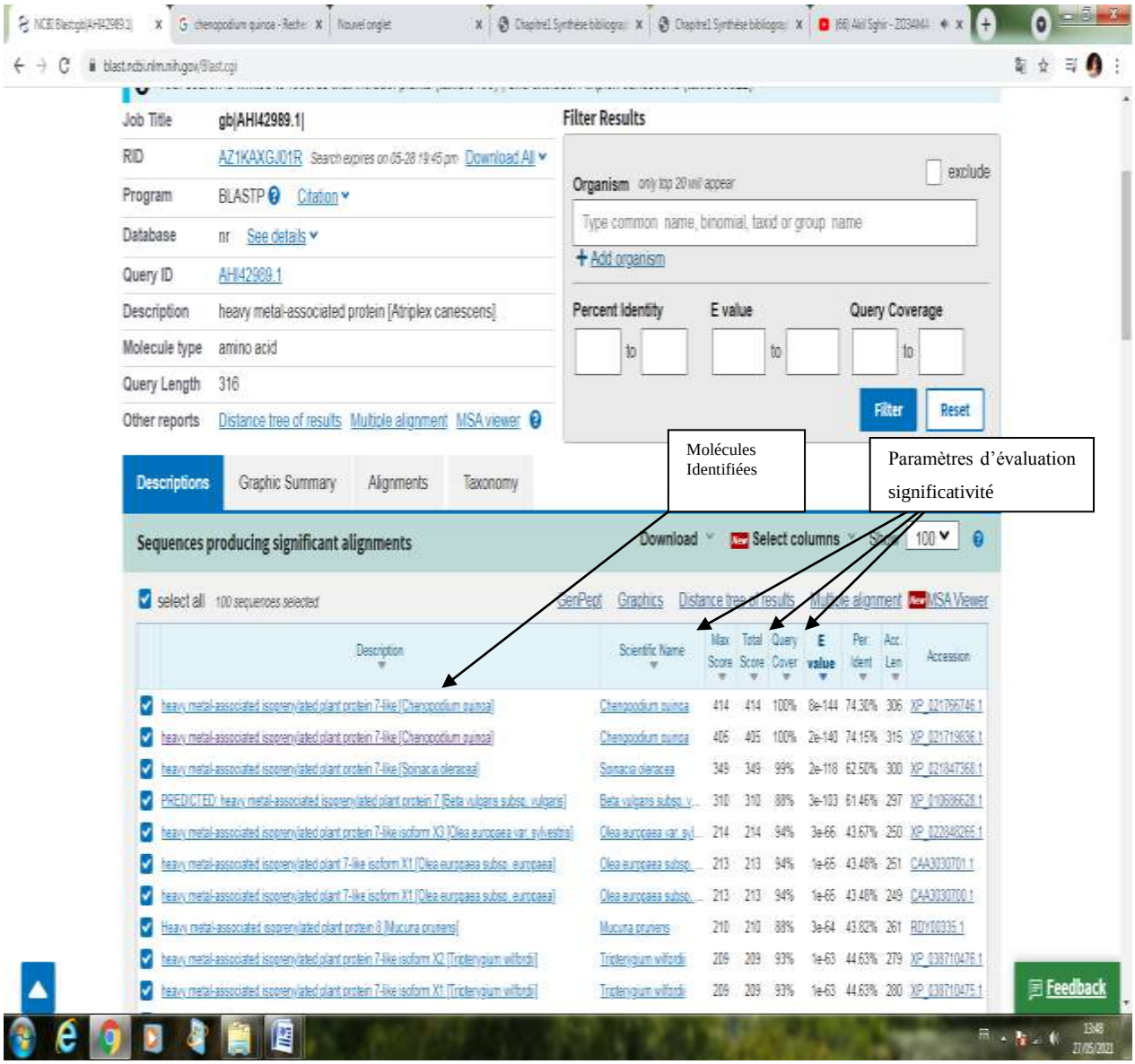

Figure 5.- Description et classement des séquences protéiques similaires obtenus par Blast

Les figures et 7 montrent les paramètres d'alignement obtenus par blast entre la séquence requête (Query sequence) et la séquence trouvée (subject).

Parmi les paramètres évalués:
- identité: 240/223 (74% résidus identiques);
- positive 261/326 (80% résidus similaires: substituions conservatrices);
- gaps (7%): un niveau acceptable.

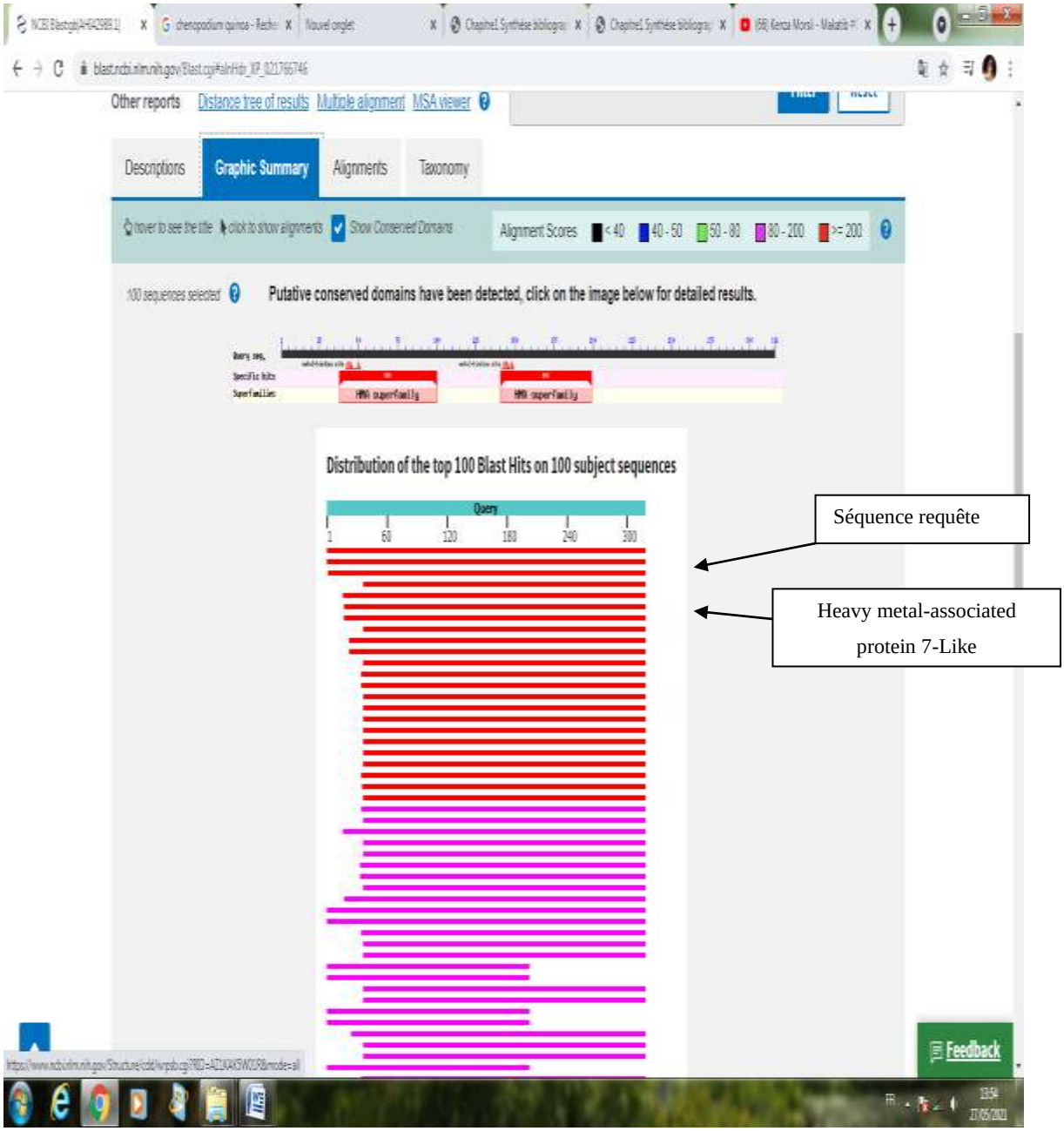

Figure 6.- Représentation graphique du BLAST sur la similitude de séquence de la protéine chez les plantes

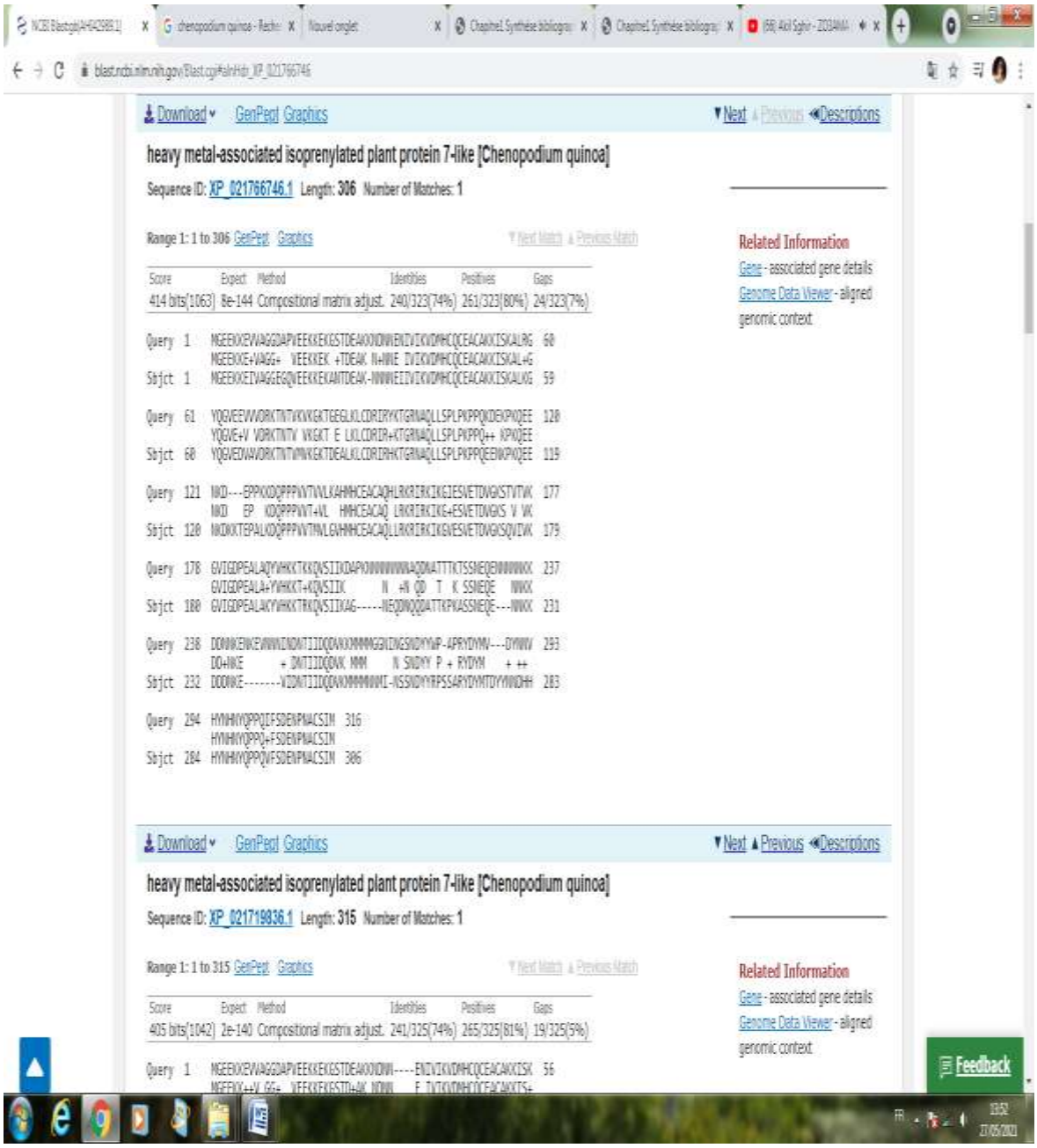

Figure 7.- Résultats d'alignement entre la séquence requête (heavy metal-associated protein) et la séquence trouvée.

Pour la recherche de similitude de séquences chez *Medicago truncatula* de la protéine (heavy metal-associated protein), il est suivi les mêmes étapes que précédemment avec comme organisme cible *Medicago truncatula*.

La protéine similaire trouvée chez *Medicago truncatula* est «heavy metal-associated isoprenylated plant protein 7» avec une identité de 39.72% une E-value: 6 (e^{-50}) et score: 169 (fig. 8)

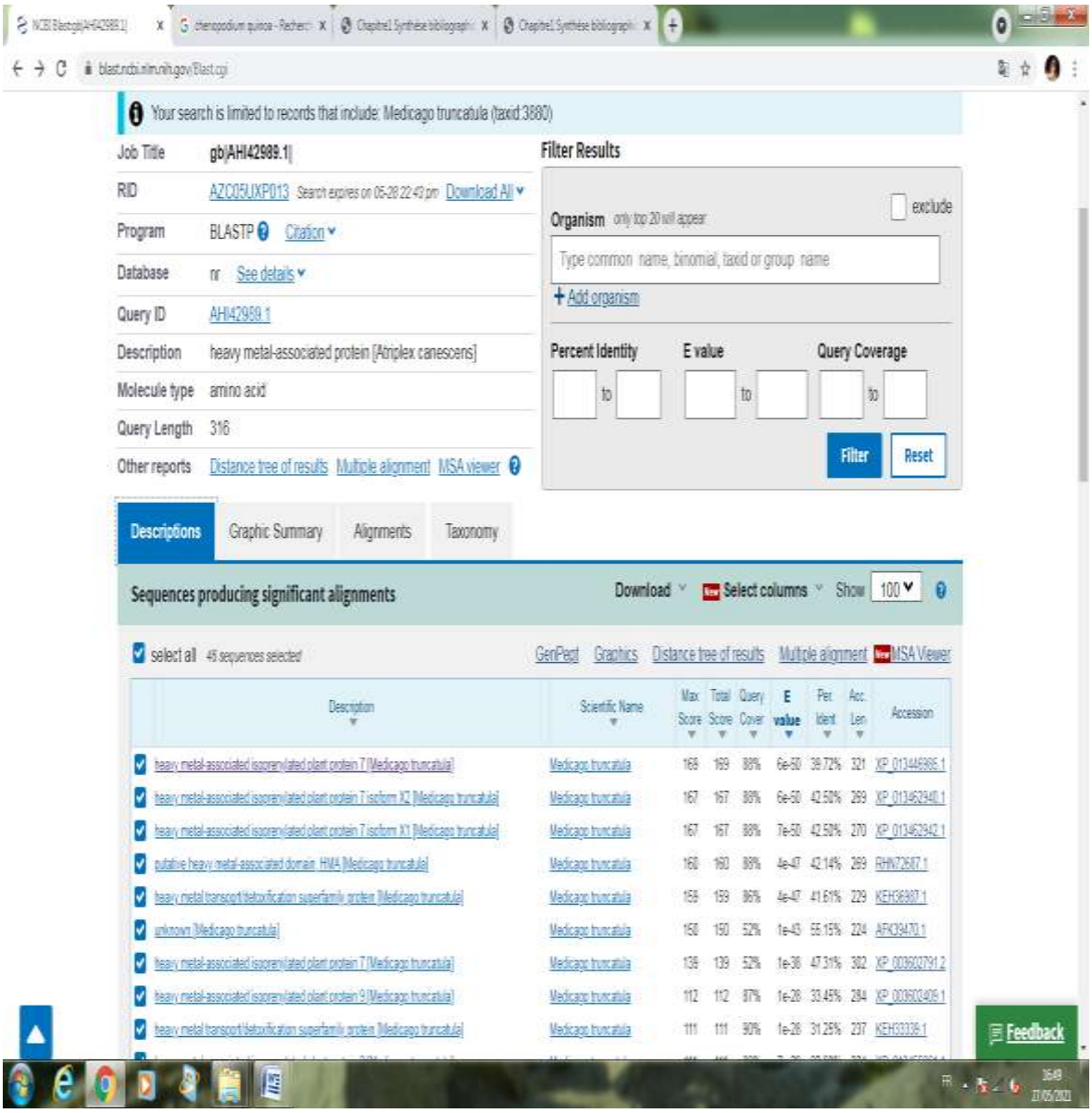

Figure 8.- Résultats des séquences protéiques similaires obtenus chez *Medicago truncatula* (heavy metal-associated isoprenylated plant protein 7)

La figure 9 montre les paramètres d'alignement obtenus par blast entre la séquence requête (Query sequence) et la séquence trouvée (subject).

Parmi les paramètres évalués:
- identité: 112/282 (40% résidus identiques);
- positive 170/282 (60% résidus similaires: substituions conservatrices);
- gaps (5%): un niveau acceptable.

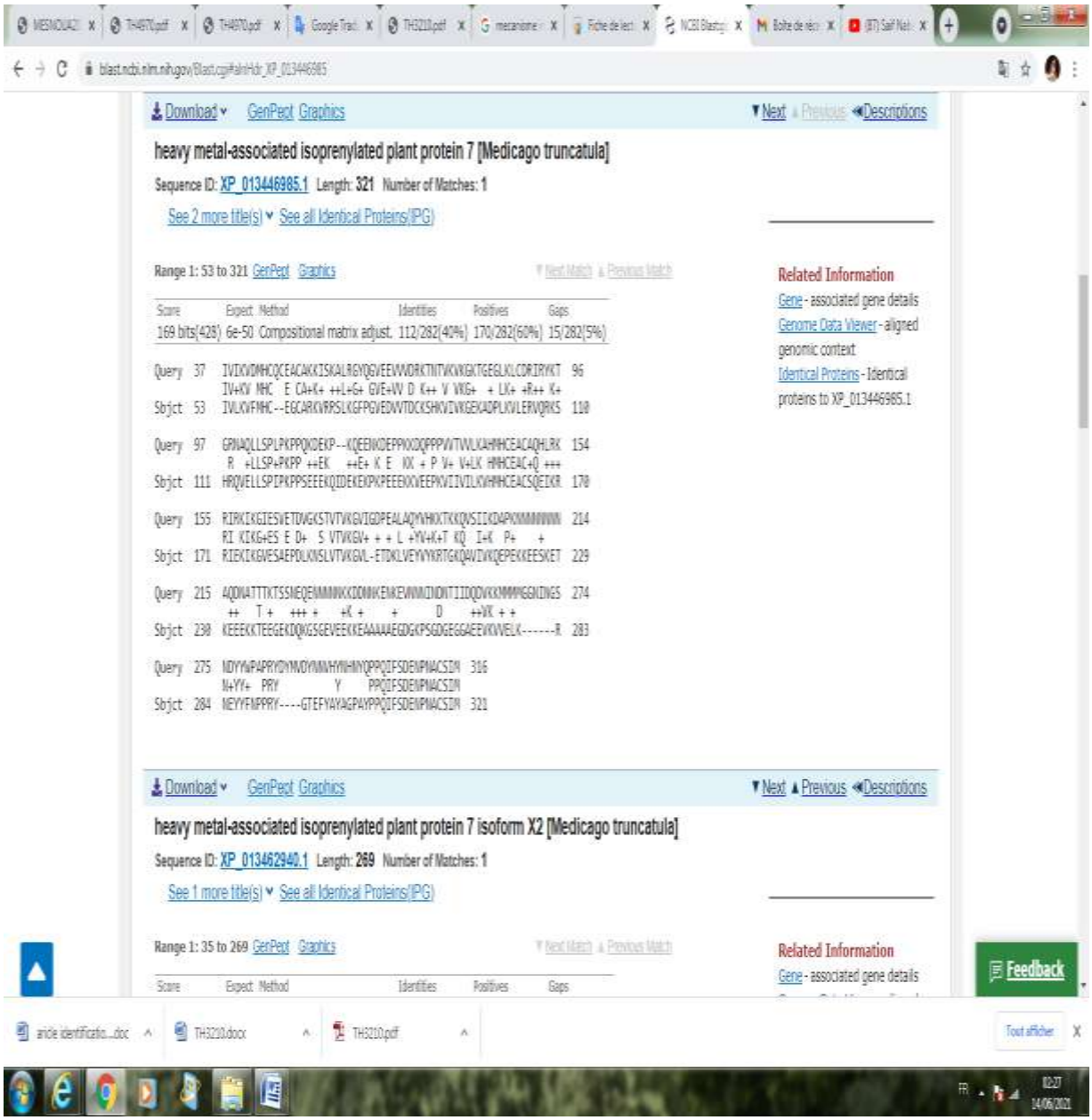

Figure 9.- Résultats d'alignement entre la séquence requête (heavy metal-associated protein) et la séquence trouvée (heavy metal-associated isoprenylated plant protein 7)

2.3.- Recherche de similitude de séquences chez *Arabidopsis thaliana* de la protéine (heavy metal-associated protein).

Il est suivi les mêmes étapes que précédemment:

Parmi les protéines classées, il a été sélectionné la troisième protéine (Heavy metal transport/detoxification superfamily protéine) de 81% d'identité, un score de 158 et une E value de 6 (e^{-46}) (fig. 10).

P-ISSN 2170-1318/ E-ISSN: 2588-1949

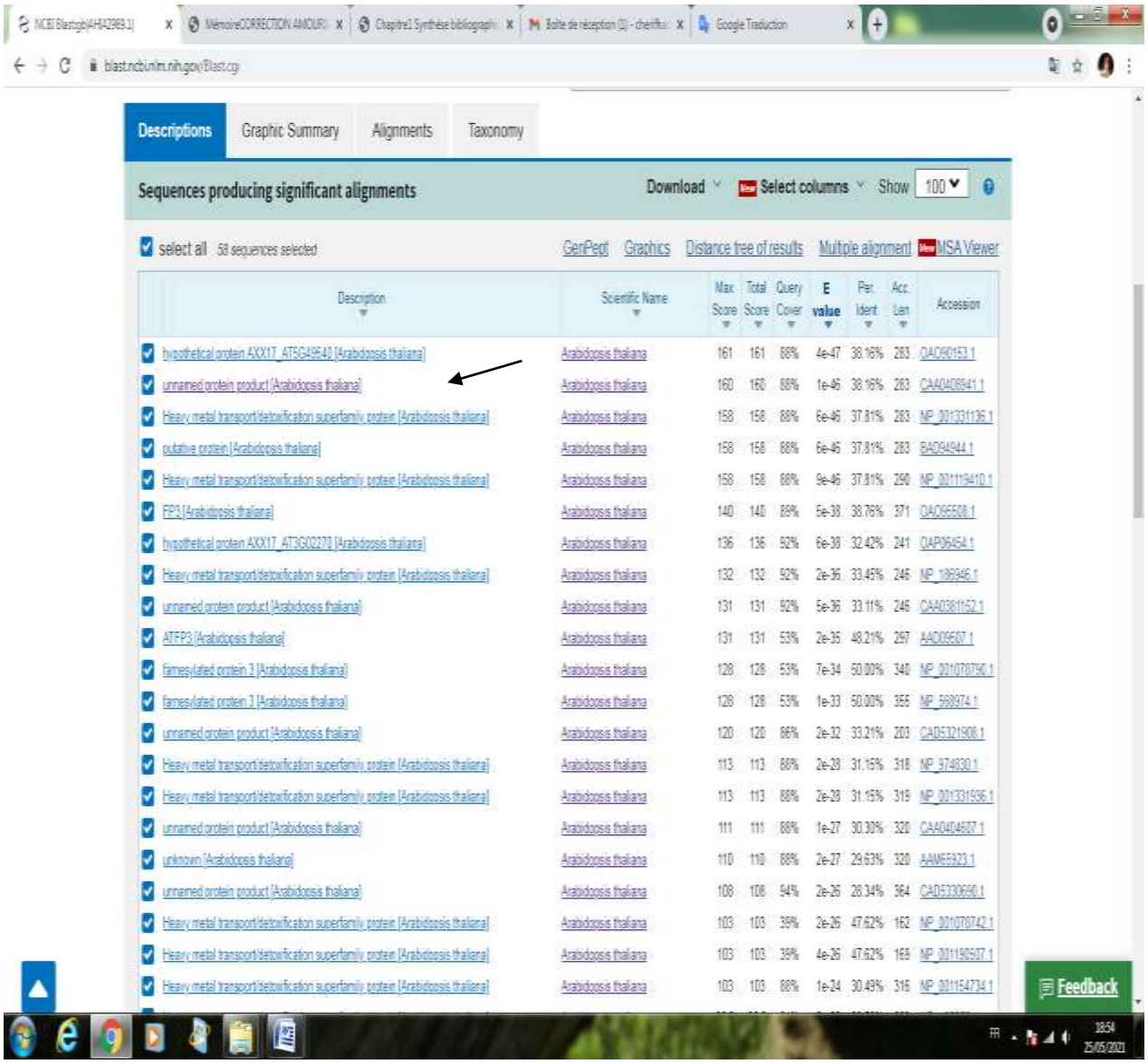

Figure 10.- Résultats des séquences protéiques similaires obtenus chez *Arabidopsis thaliana*

Les paramètres d'alignement obtenus par BLASTp entre la séquence requête (Query sequence) et la séquence trouvée (subject) sont:
- identité: 107/283 (38% résidus identiques);
- positives 157/283 (55% résidus similaires: substituions conservatrices);
- gaps (10%): un niveau acceptable.

2.4.- Résultats de recherche de la séquence codante de la protéine «heavy metal-associated protein»

En cliquant sur (CDS), il est obtenu la séquence d'ARNm codante pour la protéine «heavy metal-associated protein».

Les informations concernant la séquence codante de l'ARNm (Coding Sequence) sont représentées sur la figure 11.

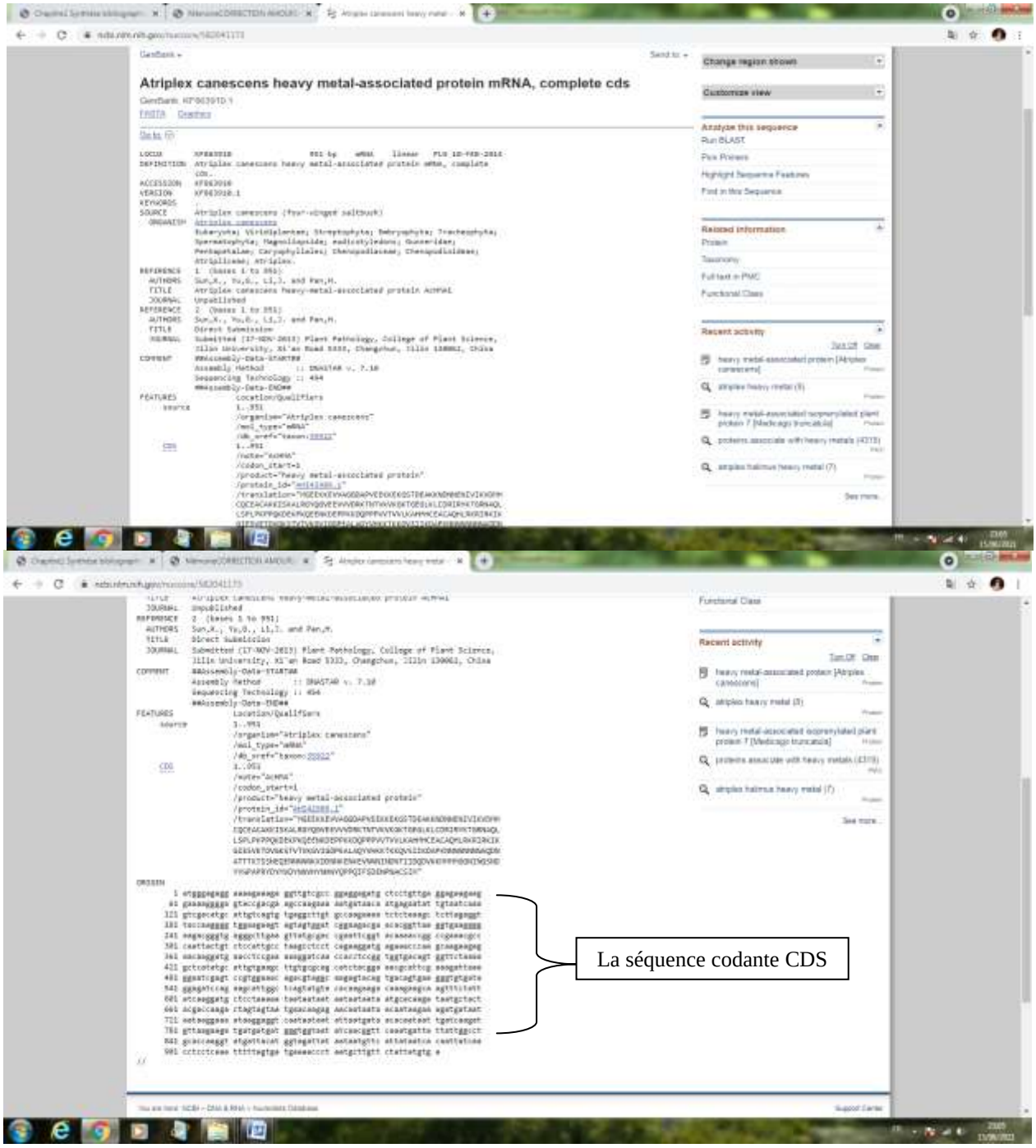

Figure 11.- Résultats de la recherche de la séquence codante de la protéine «heavy metal-associated protein»

La séquence codante (Format FASTA) est la suivante:
Atriplex canescens heavy metal-associated protein mRNA, complete cds**:**
GenBank: KF863910.1

> KF863910.1 *Atriplex canescens* heavy metal-associated protein mRNA, complete cds
ATGGGAGAGGAAAAGAAAGAGGTTGTCGCCGGAGGAGATGCTCCTGTTGAGGAGAAG
AAGGAAAAGGGGAGTACCGACGAAGCCAAGAAAAATGATAACAATGAGAATATTGT

AATCAAAGTCGACATGCATTGTCAGTGTGAGGCTTGTGCCAAGAAAATCTCTAAAGCT
CTTAGAGGTTACCAAGGGGTGGAAGAAGTAGTAGTGGATCGGAAGACGAACACGGTT
AAGGTGAAGGGGAAGACGGGTGAGGGCTTGAAGTTATGCGACCGAATTCGGTACAAA
ACCGGCCGAAACGCCCAATTACTGTCTCCATTGCCTAAGCCTCCTCAGAAGGATGAGA
AACCCAAGCAAGAAGAGAACAAGGATGAACCTCCGAAAAAGGATCAACCACCTCCGG
TGGTGACAGTGGTTCTAAAAGCTCATATGCATTGTGAAGCTTGTGCGCAGCATCTACG
GAAACGCATTCGAAAGATTAAAGGAATCGAGTCCGTGGAAACAGACGTAGGCAAGAG
TACAGTGACAGTGAAGGGTGTGATAGGAGATCCAGAAGCATTGGCTCAGTATGTACA
CAAGAAGACAAAGAAGCAAGTTTCTATTATCAAGGATGCTCCTAAAAATAATAATAAT
AATAATAATAATGCACAAGATAATGCTACTACGACCAAGACTAGTAGTAATGAACAA
GAGAACAATAATAACAATAAGAAAGATGATAATAATAAGGAAAATAAGGAGGTCAAT
AATAATATTAATGATAACACAATAATTGATCAAGATGTTAAGAAGATGATGATGATGG
GTGGTAATATCAACGGTTCAAATGATTATTATTGGCCTGCACCAAGGTATGATTACAT
GGTAGATTATAATAATGTTCATTATAATCACAATTATCAACCTCCTCAAATTTTTAGTG
ATGAAAACCCTAATGCTTGTTCTATTATGTGA

3.- **Discussion**

L'analyse «in *silico*» menée tout au long de ce travail sur la recherche des protéines de tolérance aux métaux lourds chez l'*Atriplex* via la base des données NCBI, a permis d'obtenir des informations intéressantes chez cette espèce halophile en comparaison avec les plantes en général et avec les espèces modèles tels que *Medicago truncatula* Gaertn. et *Arabidopsis thaliana* L. Parmi les protéines identifiées, les protéines associées aux métaux lourds HMAPs «Heavy metal-associated protein» (Genbank: AHI42989.1) chez l'espèce *Atriplex canescens* (Purch Nutt). Ce type de protéines contient 316 acides aminés, dont deux résidus cystéine qui sont importants dans la liaison et le transfert des ions métalliques comme le cuivre, le cadmium, le cobalt et le zinc [9] ainsi que des domaines ou motifs conservés contenant approximativement 30 acides aminées [10]. Ces mêmes auteurs ont indiqué que la localisation subcellulaire de ce type de protéines, est la membrane plasmique. En effet, il a été démontré que le cuivre pouvait endommager la membrane par oxydation des protéines membranaires [11] ou inhibition des ATPases [12]. Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion est facilitée [13]. La chélation des ions métalliques dans le cytoplasme suivie de leurs compartimentations dans les vacuoles, ainsi que la réparation des protéines endommagées par le stress métallique. Dès lors, la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire. D'ailleurs, les résultats de recherche de similitude de séquence de ce type de protéine a montré un dégré de similarité hautement significatif chez l'espèce *Chenopodium quinoa* avec la protéine (heavy metal-associated protein 7-Like), sachant que cette espèce appartient à la même famille que celle de l'*Atriplex canescens* (Purch Nutt) soit la famille des Amarantacées, deux espèces proches génétiquement. L'espèce *Chenopodium quinoa* est une pseudo céréale très riche en protéines. Récemment il a été démontré que cette plante adopte une translocation limitée des métaux lourds toxiques vers d'autres parties de la plante en particulier vers les graines. RADOVANOVIC *et al.* (2020) [13], démontrent que cette espèce a un potentiel et un fort pouvoir d'exclusion du plomb et du cadmium. Concernant la comparaison avec les espèces modèles, une similitude de séquence avec la protéine HIPPs «heavy metal –associated isoprenylated plant protein 7» a été identifiée chez la légumineuse «*Medicago truncatula* Gaertn.». Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* L., c'est la protéine similaire (Heavy metal transport / detoxification superfamily protein) qui a été identifié. Ces résultats corroborent avec les travaux de SUN *et al* (2014) [9] faite chez *Atriplex canescens* (Purch Nutt), ces mêmes auteurs ont montré que ces protéines fonctionnent comme transporteur

de métaux lourds et/ou comme protéine de détoxification.

Conclusion

D'après la recherche «*in silico*» des molécules en relation avec la tolérance aux métaux lourds chez la plante halophile *Atriplex*, il a pu être identifié trois types de protéines associées aux métaux lourds HMAPs (heavy metal-associated protein 7-Like, heavy metal –associated isoprenylated plant protein 7 et Heavy metal transport / detoxification superfamily protein) responsables de la tolérance chez l'*Atriplex canescens* et les plantes *Chenopodium quinoa, Medicago trancatula* et *Arabidopsis thaliana.* Ces trois types de protéines interviennent dans la chélation et le transport des ions métalliques ainsi que la détoxification en minimisant la translocation des ions toxiques vers les autres parties de la plante.

Références bibliographiques

[1].- Stengel P. et Gelin S., 1998.- Sol interface fragile. Ed. INRA- Paris. 213 p.

[2].- Mazoyer M., 2002.- Larousse agricole. Larousse, Montréal (Québec). 767 p

[3].- Amara R., 2011.- Impact de la pollution sur les écosystèmes côtiers: exemple de la Manche orientale, VertigO la revue électronique en sciences de l'environnement. URL: http://journals.openedition.org/vertigo/10990; doi: https://doi.org/10.4000/vertigo.10990.

[4].- Esteban R., 2006.- Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Biologie végétale. Thèse de doctorat. Université JeanMonnet - Saint-Etienne, Français, 231p.

[5].- Lefèvre I., Marchal G., Meerts P., Corréal E., Lutts S., 2009.- Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. Environmental and Experimental Botany. 65: 142–152. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.07.005

[6].- Lotmani B., Mesnoua M., 2011.- Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll et protein content in *Atriplex halimus.* African Journal of Biotechnology. 10 (50): 10143-10148, doi:10.5897/AJB10.1804.

[7].- Mateos-Naranjo E., Andrades-Moreno L., Cambrollé J., Perez-Martin A., 2013.- Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. Ecotoxicology and Environmental Safety, 90: 136–142. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.020.

[8].- Sahlman L., Wong W., Powlowski J., 1997.- A mercuric ion uptake role for the integral inner membrane protein, MerC, involved in bacterial mercuric ion resistance. Journal of Biological Chemistry, 272: 295-295.

[9].- Sun X. H., Yu G., Li J. T., Jia P., Zhang J. C., Jia C. G., Zhang Y. H., Pan H. Y., 2014.- A heavy metal-associated protein (AcHMA1) from the halophyte, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt., confers tolerance to iron and other abiotic stresses when

expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. International journal of molecular sciences, 15(8):14891–14906. URL: https://doi.org/10.3390/ijms150814891.

[10].- Dietz K. J., Baier M., Kramer U., 1999.- Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prassad, M.N.V. and Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, Pp 73-97.

[11].- Meharg A.A., 1993.- The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. Physiologia Plantarum, 88: 191-198.

[12].- Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001.- Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C. 403 p

[13].- Radovanovic V., Djekic I., Zarkovic B., 2020.- Characteristics of Cadmium and Lead Accumulation and Transfer by Chenopodium Quinoa Will. Sustainability. 12: 37-89. https://doi.org/10.3390/su12093789.