



## La technique TILLING comme nouvelle biotechnologie pour la protection et l'amélioration du blé dur (TILLING: A new biotechnological method for protection and improvement of durum wheat)

M. El Yadini <sup>1,2\*</sup>, I. Kahama <sup>2</sup>, M. Labhilili <sup>2</sup>, A. El Yadini <sup>3</sup>, M. Azeqour <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, BP: 146, 20800 Mohammedia Maroc

<sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Unité de Biotechnologie, BP. 415 Rabat Maroc.

<sup>3</sup> LS3ME, Equipe Physico-chimie des Matériaux et Environnement (EPCME), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Med V, 4 Avenue Ibn Battouta B.P. 1014, Rabat- Maroc.

Received 9 Mar 2013, Revised 26 June 2013, Accepted 26 June 2013

\* Auteur correspondant : E-mail : [elyadini.adil@gmail.com](mailto:elyadini.adil@gmail.com) ; Tel 06 62 45 06 62

### Résumé

L'approche de la génétique inverse TILLING (Identification des Lésions Induites localement dans le Génome) a été effectuée sur 1357 individus du blé dur de la variété CHAM 1 muté. La population étudiée provient de grains qui ont été traités dans une solution de MSE à 0,6 %. Elle a été conduite jusqu'à la génération M8. Le criblage des mutations au niveau de sous unités gluténines de haut et faible poids moléculaire SG-HPM et SG-FPM a été fait par électrophorèse en milieu SDS-PAGE et par marqueurs moléculaires. Les résultats ont montré huit mutants, détectés au niveau des SG-FPM, qui ont révélé un profil différent par rapport au parent CHAM1 non muté. La confirmation de ces résultats a été faite par PCR en utilisant une amorce spécifique qui permet l'amplification de la région SG-FPM et qui différencie entre le profil de bonnes ou de mauvaises propriétés technologique de blé dur.

*Mots clés* : Mutations - gluténines -MSE- TILLING- SG-LMW

### Abstract

A new reverse genetic method (Targeting Induced Local Lesion In Genom) was developed on 1357 individuals durum wheat variety Cham 1 mutated. The seeds of studied population were treated with 0,6% (v/v) EMS, and advanced to the stage of generation M8. Screening of mutations in the HMW-GS and LMW-GS was performed using one-dimensional SDS-PAGE and molecular marker. The results showed eight mutants detected in LMW-GS. Those mutants showed a different profile compared to that of the parent Cham1 unmutated. PCR with a specific primer was used as a tool of confirmation of those results, by amplification of LMW-GS region and differentiated between the profile of good or bad technological properties of durum wheat.

*Keywords*: Mutations - glutenins -EMS- TILLING- LMW-GS

### 1. Introduction

Au Maroc, la filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole. Les céréales occupent 60% de la Superficie Agricole Utile (SAU), soit 5,6 millions d'hectares, et contribuent à plus de 55% de la production agricole nationale. Au niveau de la nutrition humaine, les céréales apportent 65% des besoins en énergie et en protéines et 43% des unités fourragères dans l'alimentation du bétail. Cependant, les cultures céréalières marocaines se concentrent principalement dans les zones semi-arides et arides, qui occupent 87% des superficies totales des terres agricoles utiles, où la sécheresse constitue malheureusement un facteur qui affecte la qualité du blé dur (*Triticum durum Desf*) [1].

Très peu d'études ont été menées sur l'influence du déficit hydrique sur la composition en protéines du blé. En particulier, les protéines de réserve qui jouent un rôle clé dans la qualité technologique en lui conférant des propriétés d'élasticité et d'extensibilité qui sont essentielles pour la fonctionnalité de farines de blé [2]. Les principales protéines de réserve composées de gliadines et de gluténines monomères polymères, sont la plupart du temps responsables des caractéristiques rhéologiques de la pâte, telles que l'élasticité et l'extensibilité. Les gliadines sont subdivisées en  $\alpha$ ,  $\gamma$  et les unités w, et gluténines en faible et haut sous-unités de poids moléculaire (SG-FPM et SG-HPM, respectivement). Les rôles des composants individuels dans la fonctionnalité du gluten pâte sont complexes [3 ; 4]. Des études ont montré que les propriétés de la pâte favorables de certains cultivars

de blé dur ont été associées à la présence de SG-FPM connu sous le nom FPM-2 [5 ; 6]. Mais la possibilité de distinguer entre les cultivars de blé dur avec de bonnes ou de mauvaises propriétés technologiques nécessite l'étude des séquences de gènes de gluténines FPM et comprendre leurs fonctions. La génétique inverse donne la possibilité de cibler une séquence spécifique pour une analyse génétique, ce qui nécessite des moyens pour sélectionner une mutation ou l'identifier dans un gène choisi. Le TILLING (Identification des Lésions Induites localement dans le Génome) est une méthode qui combine l'induction d'un grand nombre de mutations aléatoires avec des mutagènes tels que l'Ethyle Méthyl Sulfonate (EMS) et des systèmes de dépistage de mutations afin de découvrir les mutations induites dans les séquences d'ADN cibles [7]. L'objectif de notre étude rentre dans un objectif global qui vise à rechercher des gènes impliqués dans la tolérance à la sécheresse ainsi que la protection des plantes vis-à-vis de ce stress biotique par l'application d'une nouvelle approche de génétique inverse, TILLING (Targeting Induced Local Lésions IN Génomes) dans le but d'améliorer les variétés de blé dur cultivé dans des zones arides.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Matériel

La population de blé dur, qui fait l'objet de notre étude, provient de la variété Cham1 dont les graines sont préalablement traitées par un agent chimique mutagène MSE (Méthanesulfonate d'éthyle) à 0,6 %. 3215 graines, issues des plantes de la génération (M1) de la variété Cham1, ont été semées sous serre à Rabat (2007-2008) afin d'obtenir la génération (M2). Les semis suivants ont été réalisés sur le domaine expérimental MARCHOUCH avec une sélection qui se fait chaque année jusqu'à l'obtention des individus allant jusqu'au stade de la génération (M8).

### 2.2. Extraction des gluténines

L'extraction se fait à partir d'un grain préalablement pesé, puis écrasé au mortier. A cette masse (m) de grain broyé placé dans un tube Eppendorf de 2 ml, on ajoute 300  $\mu$ l d'Ethanol 70% (v/v) afin d'éliminer les gliadines. Cette opération dure une heure à température ambiante avec passage au vortex toutes les 15 min afin d'homogénéiser le mélange et est répétée deux fois. Le tube Eppendorf contenant le produit est ensuite centrifugé pendant 15 min à 10000 tours/min. Le surnageant obtenu est éliminé. Au culot restant, un tampon (constitué de Tris-HCl à pH 6,8, de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), de 2-mercapto-éthanol et de bleu de bromophénol) est ajouté à raison de (V=20 x m). Le produit obtenu est laissé à température ambiante pendant 18 heures et par la suite placé dans un bain-marie bouillant à 100 °C pendant 5 minutes afin de parfaire l'extraction des protéines et leur réduction en sous-unités. Après centrifugation à 10 000 g pendant 15 minutes, 18  $\mu$ l du surnageant seront utilisés dans le cas un gel d'électrophorèse de 1,5 d'épaisseur (l'électrophorèse se fait selon la technique. Les extraits peuvent être conservés au congélateur à -20°C.

### 2.3 Extraction d'ADN génomique.

Les échantillons qui ont développé un profil différent de celui du parent CHAM1 non muté sur gel SDS-PAGE, ont été sélectionnés. Leurs ADN génomiques ont été extraits à partir de feuilles prélevées sur des plantes de la génération (M2) selon la technique CTAB décrite par [8]. Ainsi, 50 mg de feuilles lyophilisées, ont été découpés en petits morceaux et mis dans des microtubes stériles de 2ml, puis broyés à l'aide d'un broyeur à bille. La poudre obtenue est suspendue dans 1 ml de tampon d'extraction. Après homogénéisation, le mélange est incubé à 65°C sous agitation pendant une heure. Ensuite, l'extrait est refroidi dans la glace pendant 5 minutes. La séparation de l'ADN des autres constituants des cellules est réalisée par l'ajout de 800 $\mu$ l du mélange chloroforme/alcool isoamylique (V/V) (24 /1) sous agitation pendant 20 min à température ambiante. L'extrait est centrifugé à 4000 trs/mn pendant 20 mn. Trois phases sont obtenues et séparées, le culot qui se situe au fond du tube et qui est constitué de débris cellulaires associés au chloroforme, une phase intermédiaire qui contient les protéines et la phase aqueuse qui comporte l'ADN. Cette dernière est récupérée, en prenant soin de ne pas toucher l'interphase qui comporte les protéines, puis l'ADN est précipité avec 750  $\mu$ l d'Isopropanol refroidi à -20°C. Le culot d'ADN est récupéré puis lavé deux fois avec 1 ml d'Ethanol 75% refroidi à -20°C, avant d'être suspendu dans 400  $\mu$ l de tampon TE (Tris, 10 mM; EDTA, 0.1 mM) et conservé à 4°C.

### 2.3 Polymérase Chain Réaction (PCR)

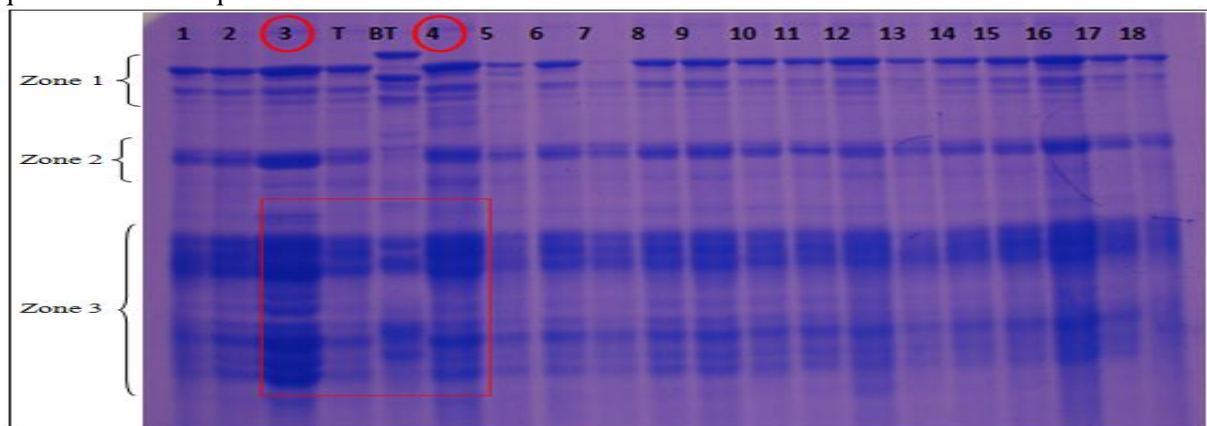
La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 25  $\mu$ l, contenant 100 ng d'ADN de chaque échantillon, 20 pM de chacune des deux amorces du gène, 1x du tampon PCR fourni avec l'enzyme Taq ADN polymérase, 2 mM de chaque dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) et 1 unité de l'enzyme Taq ADN polymérase (type Roche). La durée de la réaction commence par une phase de dénaturation de 5 minutes à 94 °C et se termine par une phase d'extension de 7 minutes à 72 °C. Lors de chaque cycle d'amplification, l'ADN est amplifié d'une manière exponentielle. Le mélange est généralement soumis à trois températures pendant 30 cycles dans un thermocycleur. Chaque cycle est composé d'une étape de dénaturation primaire à une température de l'ordre de 94 °C, une étape d'hybridation des amorces à la matrice à une température de 60 °C. Enfin, une étape d'extension à une température de 72 °C. Le programme est terminé par une incubation finale à 4°C pour préserver les échantillons.

### 3. Résultats et discussion

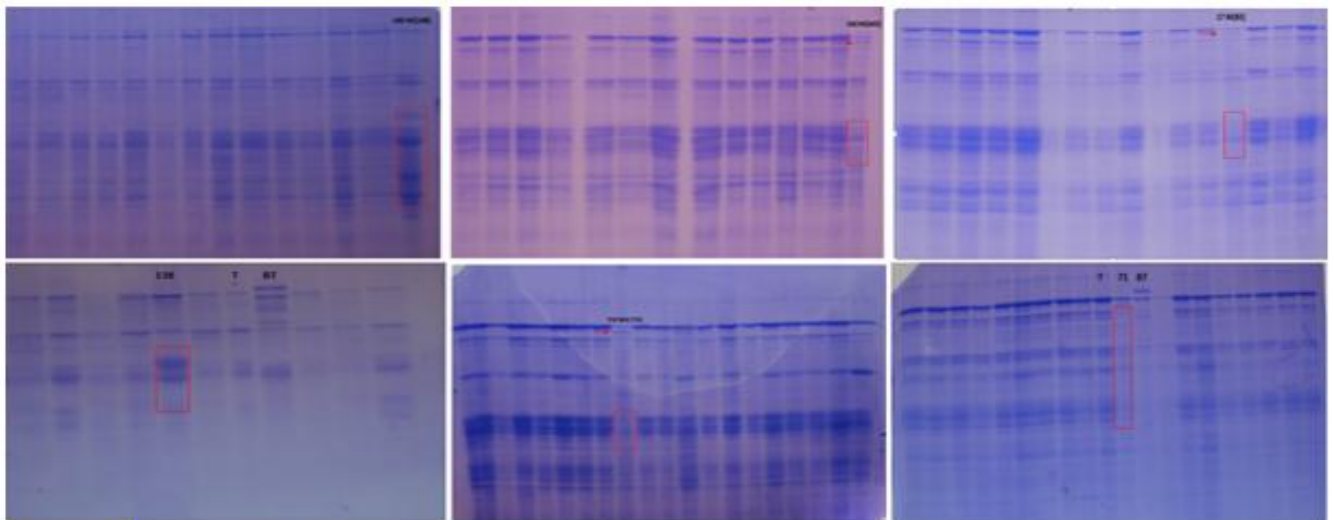
#### 3.1. Profil électrophorétique des gluténines

Le profil électrophorétique nous a permis d'estimer la diversité des sous-unités gluténines de haut et faible poids moléculaire (SG-H/FPM) des individus étudiés traités par EMS. Cette technique basée sur une extraction séquentielle des gluténines, suivie d'une électrophorèse SDS-PAGE à pH 8,8 avec T=12,8%, révèle des bandes claires et bien distinctes, trois groupes de bandes avec des mobilités différentes: les bandes lentes correspondent aux sous-unités gluténines HPM (zone 1), tandis que les bandes intermédiaires et rapides correspondent aux sous-unités gluténines FPM (zone 2 et 3).

Pour la lecture des diagrammes, nous nous sommes intéressés à la fois aux sous-unités gluténines de HPM et FPM (zone 1). En effet, non seulement leur variation peut être utilisée pour l'identification de nouveaux gènes d'intérêt qui peuvent être associés à la qualité technologique du blé, mais aussi, l'analyse comparative des sous-unités gluténines peut apporter des informations additionnelles pour le type de mutation. Les électrophorogrammes (Fig.1 ; 2 ; 3) obtenus montrent que la majorité des individus sont homogènes, sauf pour quelques échantillons qui ont subi des modifications à la fois au niveau des SG-HPM et SG-FPM.



**Figure 1.** Profil électrophorétique des gluténines FPM et HPM chez les individus ChamI traités par MSE (les deux individus 3 et 4 présentent un profil différent du témoin T= CHAM 1 non muté) (BT = blé tendre).

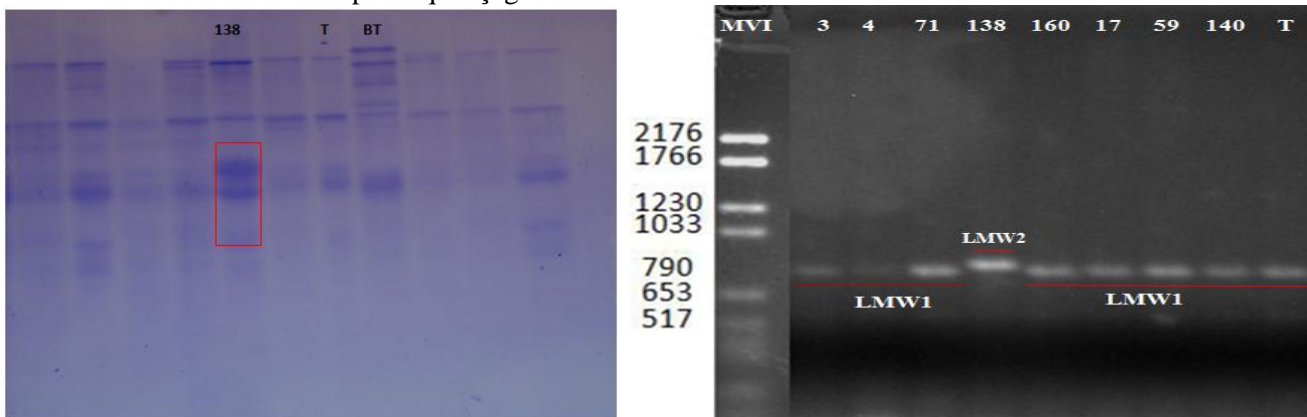


**Figure 2.** Profils électrophorétiques des autres individus mutés développant un profil différent de celui du parent Cham 1 non muté (M140, M160, M17, M138, M59, M71 T=CHAM 1 non muté).

L'analyse des gluténines et des produits PCR a montré qu'il y a une corrélation des résultats concernant l'individu 138, la mutation au niveau de cet échantillon a causé une différence de profil électrophorétique qui tend vers le type LMW-SG 2, sachant que la variété CHAM1 de blé dur est de type LMW-SG 1. Au cours des dernières années, certains rapports basés sur le rôle des allèles des SG-FPM concernant la qualité des pâtes ont été publiés. Britez et Carrillo ont montré que dans tous les cas, la présence de LMW-2 est une indication de bonnes caractéristiques technologiques [9 ;10]. Cornish et al, rapportent la présence de LMW-2 avec une

capacité de résistance de la pâte [11]. Luo et al, ont montré que les formes alléliques de SG-FPM jouent des rôles différents dans la détermination des paramètres qualitatifs [12]. L'accent mis sur la qualité convenable avec présence de LMW-2 étaient en coïncidé par Dovidio et al [13].

Les recherches effectuées par Carrillo et al ont appuyé cette théorie [10]. Donc selon la littérature on peut dire que la présence de la bande de FPM-2 chez l'individu M138 signifie que la mutation provoquée sur cet échantillon a révélé une amélioration de la qualité technologique du blé dur. Pour les autres échantillons sélectionnés l'effet de la mutation n'a pas été démontré au niveau d'ADN après réaction PCR sur gel d'agarose 2%. Cela peut être expliqué par la spécificité du mutagène chimique utilisé (Méthanesulfonate d'éthyle: MSE) qui provoque des mutations ponctuelles principalement des modifications d'un seul nucléotide cytosine en thymine C / T résultant une transformation de C / G en T / A [14], cela nécessite l'utilisation d'un enzyme spécifique de clivage (Surveyor nuclease) pour révéler le dysfonctionnement des heteroduplex et la caractérisation des mutations par séquençage.



**Figure 3.** Profil électrophorétique des gluténines et profil d'amplification du gène SG-FPM des 8 échantillons sélectionnés

## Conclusion

L'amélioration des céréales par le biais des croisements entre les variétés est basée sur la sélection des caractères améliorés des deux parents. En l'absence du caractère recherché, la création de nouveaux génotypes par la mutagenèse (EMS) et l'utilisation de la génétique inverse (Tilling), permet la création de nouveaux gènes d'intérêt et d'étudier leurs fonctions. Une population de lignées a été créée à partir de la variété Cham1 à large adaptation. Les paramètres de qualité tel que les profils protéiques des gluténines et l'analyse moléculaire du marqueur associé à la sous-unité de gluténine de faible poids moléculaire (LMW) de type 1, ont montré pour certains génotypes, des mutations au niveau des gluténines de faible poids moléculaire (LMW). Ces mutations peuvent engendrées une amélioration de la qualité technologique de blé dur.

## References

1. Blumenthal C.S, Barlow EW.R., Wrigley C.W. *J. Cereal. Sci.* 18 (1993) 3–21.
2. Shewry P.R., Tatham A.S., Barro F., Barcelo P., Lazzeri P., *Nat. Biotech.* 13 (1995) 1185-1190.
3. Gupta R. B., Batey I. L., and Maritchie, F., *Cereal. Chem.* 69 (1992) 125-131.
4. Khatkar, B. S., Fido R. J., Tatham A. S., and Schofield, J. D., *J. Cereal. Sci.* 35 ( 2002) 307-313.
5. Payne T.L., Richerson J.V., Dickens J.C., West J.R., Mori K., Berisford C.W., Hedden R.L., *J. Chem. Ecol.* 8 (1982) 873-881.
6. Masci S., D'ovidio R., Lafiandra D., *Theor. Appl. Genet.* 100 (2000) 396-400.
7. Mccallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff, S., *Nat Biotech.* 18 (2000) 455–457.
8. Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen, R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 (1984) 8014-8018.
9. Brites C., Carrillo, M.J., *Cereal Chem.* 78 (2001) 59- 63.
10. Carrillo J.M., Vazquez, J.F., Orellan, J., *Plan. Breed.* 104 (1990) 325-333.
11. Cornish G.B., Bekes, F., Allen, H.M., *Aust. J. Agr. Res.* 52 (2000) 1339-1348.
12. Luo C., Giffin, W.B., Branlard, G., *Theor. Appl. Genet.* 102 (2001) 1088-1098.
13. D'ovidio R., Marchitelli, C., Ercoli, C., *Theor. Appl. Genet.* 98 (1999) 455-461.
14. Henikoff S., Comai, L., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 54 (2003) 375–401.