

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF Γ GLIADIN FROM DURUM WHEAT
(*TRITICUM TURGIDUM L. SUBSP. DURUM* ((DESF.) HUSN.))

R. Mzid¹, M. Ayadi^{1,2}, R. Ben Ayed^{2,*}, E. Menzli¹, E. Babay³ et M. Hanana¹

¹Laboratoire des Plantes Extrêmophiles, Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria (CBBC), BP901, Hammam-Lif 2050, Tunisie.

²Laboratoire de Criblage Moléculaire et Cellulaire des Procédés. Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Route Sidi Mansour Km 6, B.P « 1177 ». 3018 Sfax, Tunisie.

³Banque Nationale de Gènes, Boulevard du leader YASSER ARAFAT, Z.I. la Charguia 1080 Tunisie.

Received: 07 Mars 2017 / Accepted: 12 August 2017 / Published online: 01 September 2017

ABSTRACT

The gluten quality is one of the main factors affecting the quality of durum wheat. It depends primarily on its storage proteins composition (glutenins and gliadins). In order to set up and initiate a technological quality improvement program of durum wheat we have conducted a prospection of the different protein sequences of gliadin in different databases for *Triticum*, then the filtration steps and assembly by appropriate software have been conducted to reduce the number of redundant sequences. On the other hand, we have isolated a gene from Iride "*Gli-A1*" encoding a γ -gliadin protein associated with gluten strength and viscoelasticity of the dough, we performed an *in silico* molecular and structural analysis in order to define its putative functional properties. The latter could be a valuable candidate as molecular marker for selecting high nutritive value of durum wheat and/or for genetic improvement of durum wheat quality.

Keywords: *in silico*; Storage Proteins; Gliadin; *Triticum* ; *wheat*; technological quality.

Author Correspondence, e-mail: raydabenayed@yahoo.fr

doi: <http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v9i3.16>



1. INTRODUCTION

La production mondiale de blé dur est concentrée au niveau d'un nombre limité de pays et dont les quatre premiers producteurs mondiaux sont l'Union Européenne, la Turquie, le Canada et les Etats-Unis qui représentent à eux seuls les deux tiers de la production mondiale [1]. Au niveau du bassin méditerranéen, le blé dur est généralement cultivé dans les conditions pluviales, impliquant des contraintes environnementales pouvant avoir des répercussions négatives sur les rendements ainsi que sur la qualité de la production. Or la qualité du gluten est l'un des principaux facteurs conditionnant le produit fini. En effet, tout au long du processus de production, dès le semis de la graine jusqu'à ce qu'elle atteigne le produit final chez le consommateur, la qualité est une notion faisant intervenir plusieurs disciplines et secteurs notamment les entreprises semencières, les agriculteurs, les usines de semoule et de pâte et également la demande du marché et les exigences du consommateur [2]. Celle-ci dépend principalement de la composition en protéines de réserve constituées par les gliadines et gluténines. Les différences qui définissent la propriété de la pâte et sa qualité de cuisson sont essentiellement déterminées par les effets additifs de la teneur en protéines, les compositions alléliques des différentes sous-unités de gliadine et de gluténine de haut poids moléculaire (HMW-GS) et de faible poids moléculaire (LMW-GS). Il est bien connu que plus de 70% de la variation des différents paramètres de qualité de la pâte est expliquée par la composition des protéines de stockage du grain de blé [3]. Le taux de protéines est un critère déterminant sur le marché. Ces protéines sont déterminantes pour conférer au gluten la capacité de former un réseau viscoélastique au cours des processus technologiques. Les gliadines sont responsables de la viscosité du réseau alors que les gluténines sont davantage responsables de l'élasticité et de la fermeté de la pâte [4]. En effet c'est le ratio élevé de gluténines/gliadines qui est le critère déterminant de la bonne qualité du blé dur [5]. L'amélioration de la qualité technologique du grain est un objectif majeur des programmes d'amélioration. En effet, la structure et la composition de l'endosperme mature, y compris la teneur en protéines, la dureté du grain et la qualité de l'amidon, sont des facteurs importants dans la détermination de l'utilisation finale de la farine de blé. Jusqu'à présent, ces études ont porté sur deux aspects de qualité qui sont principalement déterminés par le grain (composition des protéines): la force de la pâte et la texture du grain (dureté) [6]. Plusieurs études ont signalé la production de plantes transgéniques de blés surexprimant plusieurs gènes HMW-GS chez le blé tendre [7 ; 8 ; 9] ainsi que LMW- GS chez le blé dur [10 ; 11 ; 12]. Dans tous les cas, des modifications des propriétés visco-élastiques de la pâte dérivée ont été observées [13]. Du blé commercial a été conçu avec succès avec la sur-expression de la sous-unité HMW du gène

gluténine *Glu-Ax1*, conduisant à une augmentation de la quantité totale de protéines et des sous-unités HMW dans les grains de plantes de blé transgéniques [14]. Jusqu'à présent, la famille des gliadines n'a pas été utilisée comme gène candidat pour l'amélioration de la qualité technologique des céréales. Au cours de ce travail nous nous sommes intéressés d'une part à la famille des gliadines chez le genre *Triticum* et d'autre part à un gène candidat associé à la qualité technologique du blé à savoir la γ gliadine. Nous avons étudié et analysé certains aspects structuraux (structure primaire, secondaire et tertiaire) et les principales modifications post-traductionnelles de cette protéine codée par le gène en question. Cette approche constitue un pré-requis afin de programmer et d'envisager l'application des outils de la transgénèse dans le but d'améliorer la qualité technologique du blé et de ses sous-produits dérivés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Analyse phylogénique des gliadines

Nous avons réalisé notre prospection sur différentes Bases de Données (BD) générales et spécifiques, publiques et/ou privées dans lesquelles la fouille puis la collecte des séquences nucléiques complètes (ADNc) et des séquences protéiques ont été effectuées. L'analyse phylogénétique permet de déceler des différences et des similitudes d'organisation structurale entre différentes séquences. Pour ce faire, notre prospection dans les différentes BD a abouti au recensement de 1159 séquences complètes d'ADNc codant différents types de gliadines et appartenant à quelques espèces cultivées du genre *Triticum* (*Triticum aestivum* et *Triticum turgidum subsp. durum*). La filtration de ces séquences a permis de réduire le nombre total de 1159 à 532 séquences identifiées.

2.1.1. Structure et classification des gliadines

Nous avons établi les relations phylogénétiques entre les différentes gliadines (γ , α ($\alpha+\beta$) et ω) identifiées chez *Triticum aestivum*. Nous avons utilisé la matrice de Jones-Taylor Thornton (JTT) [15]. Un arbre circulaire phylogénétique non enraciné a été obtenu selon l'alignement de 532 séquences de gliadines obtenues par la prospection à partir de NCBI et de GrainGenes (Figure 1).

Selon la figure 1, les séquences protéiques sont regroupées en 4 groupes chez *Triticum aestivum*:

- * Groupe I: regroupe les α -gliadines ;
- * Groupe II: regroupe les gliadines mixtes ($\alpha+\beta$) et les « avenin-like seed protein » ;
- * Groupe III: regroupe les ω -gliadines ;
- * Groupe IV: constitué de toutes les γ -gliadines.

D'après cette analyse phylogénétique les γ -gliadines présentent 70% de similarité avec les α -gliadines alors que les ω -gliadines partagent seulement 20% de similarité. Cette analyse de similarité révèle que les gliadines ont une vaste variabilité allélique, diversité intéressante sachant qu'elles influencent la qualité de la farine [5]. En effet, des analyses par électrophorèse montrent une forte association entre la présence de la γ -gliadine de type 45 et la force du gluten [16]. Plusieurs auteurs suggèrent que cette corrélation pourrait être causée soit par une relation directe et fonctionnelle aux gènes responsables, soit que les gènes responsables de ces caractéristiques de gluten sont liés à d'autres gènes codant ces protéines. Damidaux *et al.* (1980) [17] ont constaté que les allèles des gliadines γ -42 et γ -45 sont issus d'un locus situé sur le chromosome 1B. Ultérieurement, la localisation chromosomique des blocs de gliadines (ω -35 / γ -45) et (ω -33, 35,38/ γ -42) a été déterminée sur le bras court du chromosome 1B [18]. Selon Ruiz *et al.* (2005) [19], la gliadine γ -42 et la gliadine γ -45 sont fréquemment héritées en bloc respectivement avec la ω -gliadine 33-35-38 et la ω -gliadine 35. Payne *et al.* (1984) [20] ont conclu que l'association avec la force du gluten semble être causée par les LMW-GS liées à la gliadine γ -45 et non pas par la γ -45 elle-même. Ces auteurs ont montré aussi que la gliadine γ -42 avec ω -33, 35 et 38 et la gliadine γ -45 avec la gliadine ω -35 étaient étroitement liées à deux différents types de gluténine de faible poids moléculaire respectivement LMW-1 et LMW-2 codées par les allèles du locus *Glu-B3*.

2.1.2. Analyse des différentes γ -gliadines

Les séquences γ -gliadines collectées sont traitées par le logiciel MEGA 6.06 pour définir leur modèle structurale chez le blé dur (Figure 2). Les 29 protéines ont tous une structure typique de γ -gliadine commençant par un peptide signal de 20 résidus, suivie d'une courte région N-terminale correspondant au domaine non répétitif (I), d'un domaine répétitif très variable (II) riche en glutamine et proline, d'un domaine non-répétitif contenant la plupart de résidus cystéines (III) et d'un domaine non-répétitif C-terminal contenant les deux derniers conservés des résidus de cystéine (V). La majorité de ces domaines III contient 8 résidus de cystéine qui sont connus pour former 4 liaisons disulfures intra-chaîne [21]. Afin de définir les différents motifs composant ces protéines, nous avons réalisé une phylogénie associée à une analyse par le logiciel MEME. Le dendrogramme de la figure 3 et le tableau IA montrent la classification des γ gliadines en fonction de leurs structures et de la position des motifs. La taille des séquences varie de 239 à 302 résidus d'acides aminés, avec une moyenne de 278 aa. Cette variation de taille résulte principalement de l'insertion et/ou suppression de motifs répétés [22]. 16 peptides parmi 29 contiennent huit résidus cystéine qui forment quatre liaisons disulfures intramoléculeaires [23] à l'exception des séquences dont le numéro

d'accession est le suivant AEG47685, AEG47686 et ACJ03438 qui contiennent respectivement 2, 3 et 9 résidus cystéine. Par la suite, notre intérêt s'est focalisé sur la séquence γ gliadine AAQ63864 de blé dur. Cette séquence est la plus proche homologue à la protéine AAQ63861 [24]. L'analyse de l'alignement des différentes γ -gliadines montre une diversité au niveau des motifs répétés illustré dans le tableau IB.

2. 2. Caractérisation moléculaire *in silico* de la γ gliadine

La protéine AAQ63864 est une γ -gliadine dont le gène mesure 721 pb et est composé d'un seul exon sans intron. Le locus de ce gène n'est pas encore identifié en raison de l'absence de séquence complète et finie du génome de blé.

2. 2. 1 Caractérisation structurale

Il est difficile de trouver expérimentalement la fonction d'une protéine sans aucune connaissance préalable sur sa structure *in silico*. En effet, un minimum d'informations sur la structure est nécessaire comme point de départ tel que l'enchaînement linéaire d'acides aminés appelé structure primaire, les liaisons faibles, les liaisons hydrogène, ses formes (en hélice ou en feuillet) qui représentent la structure dite secondaire, la disposition relative des motifs de base qui conduit à la structure tridimensionnelle et la localisation cellulaire. La séquence peptidique AAQ63864 est composée de 242 résidus d'aa. Elle possède une masse moléculaire estimée à 34,3 KDa ainsi qu'un point isoélectrique théorique de 7,6. Le nombre d'atomes qui constitue cette protéine est de 4772 atomes se présentant sous la formule suivante $C_{1526}H_{2359}N_{429}O_{442}S_{16}$. La composition peptidique de cette γ -gliadine révèle que les acides aminés les plus fréquents sont la glutamine (29.8%) et la proline (16.6%) (Tableau II A). La protéine renferme d'une part, les acides aminés hydrophobes nécessaires à la formation de l'hélice α représentant 46,1% et d'autre part, les acides aminés favorables à la formation des liaisons hydrogène, et donc à la stabilisation de la protéine qui représentent 43%. La cystéine est présente à 3% conférant à la protéine une certaine rigidité par la formation des ponts disulfures et stabilisant sa conformation spatiale. Le nombre total de résidus chargés négativement est de 7 tandis que celui des résidus chargés positivement est de 14. L'index aliphatique, qui rend compte de la stabilité de la protéine vis-à-vis de la température, est de 66.19 et la moyenne d'hydrophobicité est de -0.681. La séquence de la protéine AAQ63864, différente des autres γ -gliadines, contient 9 cystéines avec des motifs répétés. Ces domaines répétitifs sont de type PFPQ1-2 (PQQ) 1-2 décrit par Qi *et al.* (2009) [23]. L'analyse de la structure secondaire de la γ -gliadine AAQ63864 révèle une structure organisée entièrement en chaînes enroulées et coudes sans hélice α ni feuillet β favorisant ainsi une structure en spirale (Tableau II B). Les possibilités de liaisons peptidiques et d'établissement de ponts disulfures

sont décrites dans la figure 4, indiquant la possibilité d'association par des liaisons non covalentes et d'adopter ainsi un comportement agrégatif.

L'analyse de la structure tertiaire de cette γ -gliadine montre la présence de régions, allant de 42 à 60 et de 120 à 138, possédant une capacité de former une structure hélicoïdale amphiphile chargée positivement et présentant des résidus aromatiques tels que la Phénylalanine (F), et la Tyrosine (Y) (Figure 5). La recherche d'homologie de structure tertiaire de la protéine AAQ63864 dans la BD Protein Data Bank a permis d'identifier la structure tridimensionnelle la plus proche au domaine C terminal (position 185 à 241). Il s'agit du domaine de liaison à l'ADN des protéines Alpha-amylase (catalysant l'hydrolyse des liaisons alpha-D- (1,4)- glucane des composés de l'amidon). En effet, aucun travail de cristallisation de cette famille de protéine n'a pas été jusqu'à présent entrepris.

Les modifications post-traductionnelles des protéines ont pour intérêt la régulation de leur activité et ceci en les intégrant à une cascade de signalisation, en les adressant à un compartiment cellulaire, en facilitant leur interaction avec d'autres protéines et en favorisant la stabilité de leur structure. Ainsi, les réactions de phosphorylation/déphosphorylation induisent une modification de la structure des protéines et donc de leur activité et permettront ainsi la régulation de différentes voies métaboliques. Trois sites de phosphorylation de cette protéine se trouvent dans la région C-terminale (Figure 6 A). Ce type de modification post-traductionnelle sert à la signalisation cellulaire et représente un mécanisme impliqué dans la régulation de l'activité de la protéine.

Le serveur NetAcet1.0 détecte un seul site d'acétylation au début de la séquence protéique dont le motif est «MKTLII». La localisation subcellulaire de cette gliadine a été prédite par les logiciels disponibles sur ExPASy (ProtComp version 9.0 et PredictProtein). Cette protéine est éventuellement localisée au niveau de la vacuole, confirmant ainsi son rôle de réserve d'azote, de carbone et de soufre. Aucun site de sumoylation ni de N-glycosylation n'a été prédit.

2. 2. 2. La recherche de motifs

La recherche dans la BD CDD 'Conserved Domain Database' montre la présence du domaine Alpha-Amylase Inhibitor qui débute de l'aa 10 jusqu'à la position 110 sur une protéine de 302 aa (Figure 6 B). La superfamille AAI_LTSS est sous l'accèsion cl7890, en particulier cd0010 et cd00261. La superfamille de protéines Alpha-Amylase Inhibitors (AAIs) et Seed Storage (SS) se présente dans différentes espèces végétales, l'AAIS joue un rôle de défense naturelle contre les pathogènes [25].

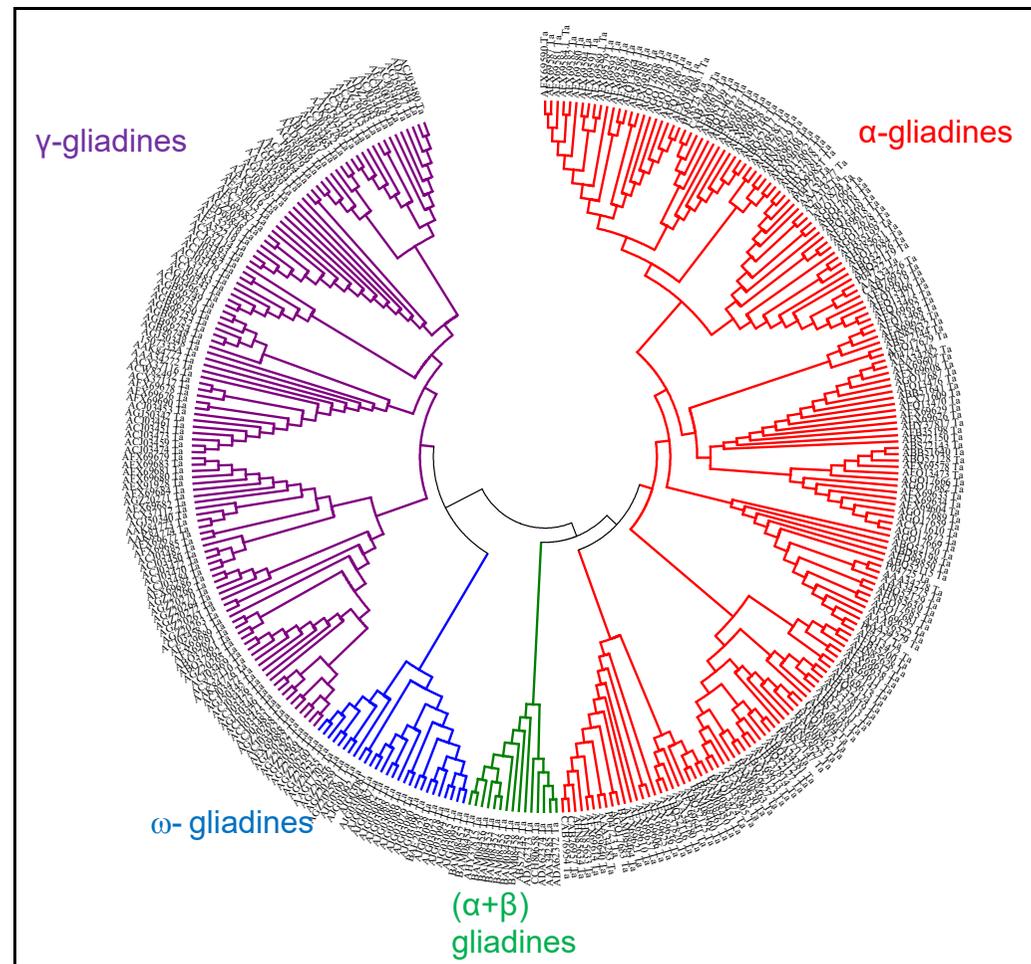


Fig.1. Arbre phylogénétique circulaire représentant les relations entre les différents types de gliadines chez *Triticum aestivum*. 532 séquences protéiques ont été alignées par Clustal X [26]. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode Neighbor-Joining (bootstrap =1000). La distance évolutive est calculée selon la méthode JTT matrix [15]. Les analyses phylogénétiques sont réalisées par MEGA 6.06 [26].

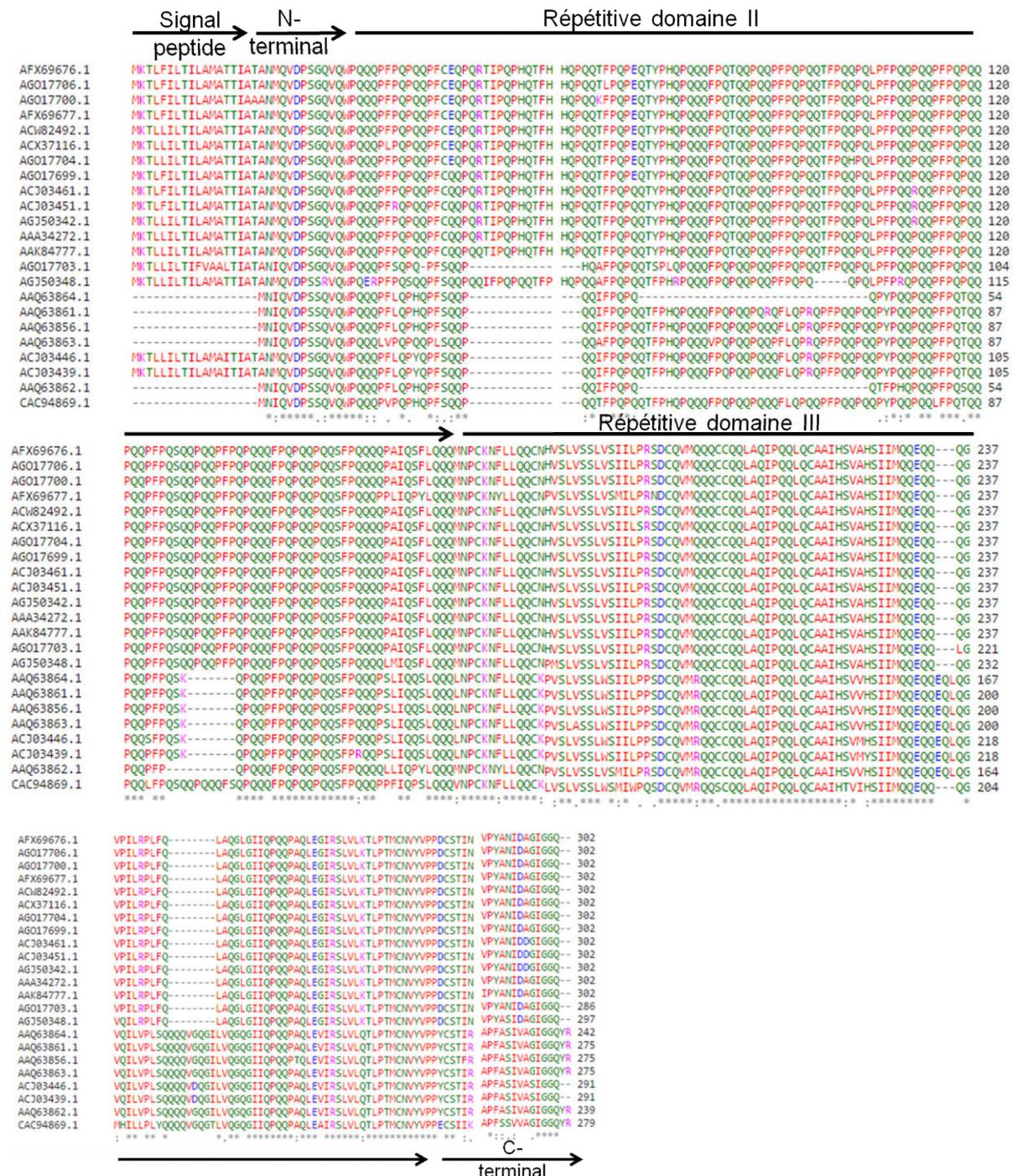


Fig.2. Alignement multiple des séquences protéiques de la famille γ -gliadine chez *Triticum aestivum* et *turgidum*. L'alignement est réalisé par ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Les acides animés formant le domaine conservé des gliadines et les motifs sont colorés et les gaps sont marqués par des tirets.

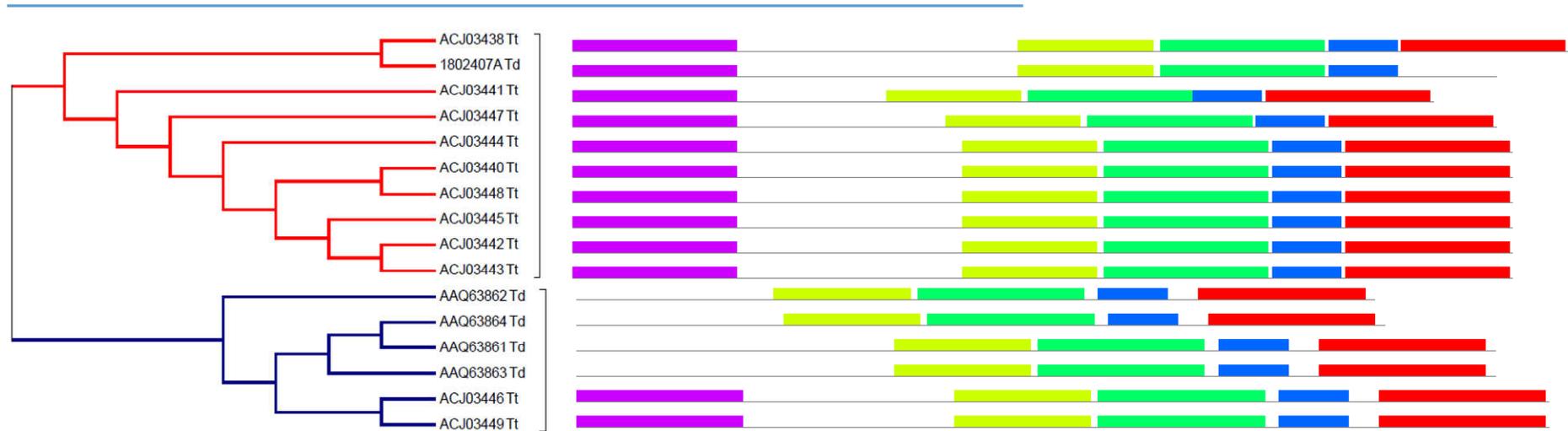


Fig.3. Analyse phylogénétique de toutes les protéines γ -gliadines chez *Triticum turgidum* par MEGA 6.06 [27]. Les motifs des acides animés des protéines γ -gliadines sont analysés par Meme v4.8.1.

Table 1. A. Description des différents motifs protéiques identifiés par le programme MEME v4.8.
B. Comparaison entre les différents motifs répétés chez les différentes γ -gliadines.

A.

Motif	Longueur	Best possible match
1(violet)	50	GIIQPQQPAQYEVIRSLVLRITLPMCNVYVRPDCSTINAPFASIVAGIGG
2 (pistache)	50	CKHVSLSVSSLWSMILPRSDCQVMRQQCCQQLAQIPRQLQCAAIHSVVHSI
3 (vert)	50	MKTLFILAMILAMATTIATANMQVDPSGQVQWPQQQPFREPYQPFYEQPQR
4 (bleu)	41	KQPQQFPQPQQPQQSFQQQQPLIQPYLQQQMNPCKNYLL
5 (rouge)	21	EEQEELQGVQILRPLFQLVQG

B.

Motifs répétés chez le reste des séquences	Motifs répétés chez la séquence AAQ63864 de <i>T. turgidum</i>	
PQQ	LFPQ	FPQ
PVPQ	QFSQ	PQQ
PFSQQ	TQQ PQQ	FPQPQQ
FFPQ	SQQ	PQPQQ
QFPQ	PHQ	FPQQ
QFLQ	PFSQ	PQQQ
PFQPQQ	PQPQQPQQ	QQQ
PFPQ	FPQQ/ PQQQ	

Table 2. A. Composition en acides aminés de la γ -gliadine AAQ63864.**B.** Présentation de la séquence de la protéine AAQ63864**A.**

	Acides aminés	Nombre	Pourcentage %
Acides aminés hydrophobes à groupement R apolaire 37,2%	Ala (A)	7	2,9
	Pro (P)	35	14,5
	Trp (W)	2	0,8
	Val (V)	16	6,6
	Leu (L)	21	7
	Met (M)	4	1,7
	Phe (F)	9	3,7
	Ile (I)	17	7,0
Acides aminés hydrophiles à groupement R polaire 48,9%	Gly (G)	8	3,3
	Ser (S)	18	7,4
	Cys (C)	8	3,3
	Gln (Q)	72	29,8
	Asn (N)	4	1,7
	Tyr (Y)	4	1,7
	Thr (T)	4	1,7
Acides aminés à groupement R chargé négativement à pH neutre	Asp (D)	2	0,8
	Glu (E)	3	1,2
Acides aminés à groupement R chargé positivement à pH neutre	His (H)	3	1,2
	Lys (K)	3	1,2
	Arg (R)	4	1,7

B.

Structure secondaire	Hélice α	Feuillet β	loop
Longueur de la séquence		302	
%	0	0	100

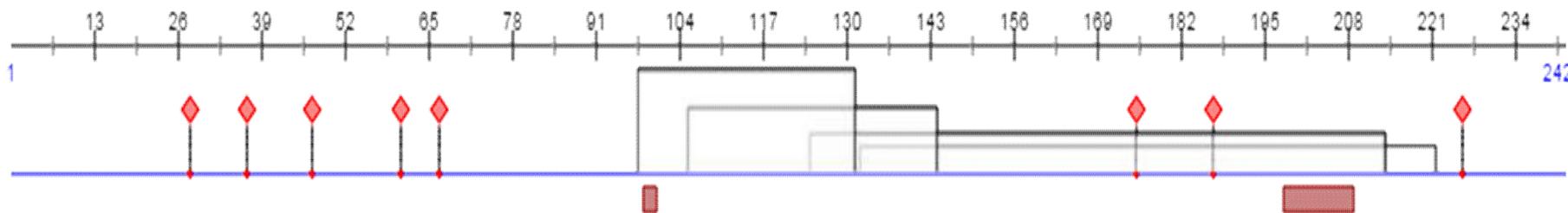


Fig. 4. Prédiction de l'état de liaison disulfure de la γ -gliadine AAQ63864. Les losanges en rouge représentent des régions de liaison protéique. Les lignes représentent les liaisons disulfures. Les rectangles en rouge représentent la capacité de former une structure hélicoïdale

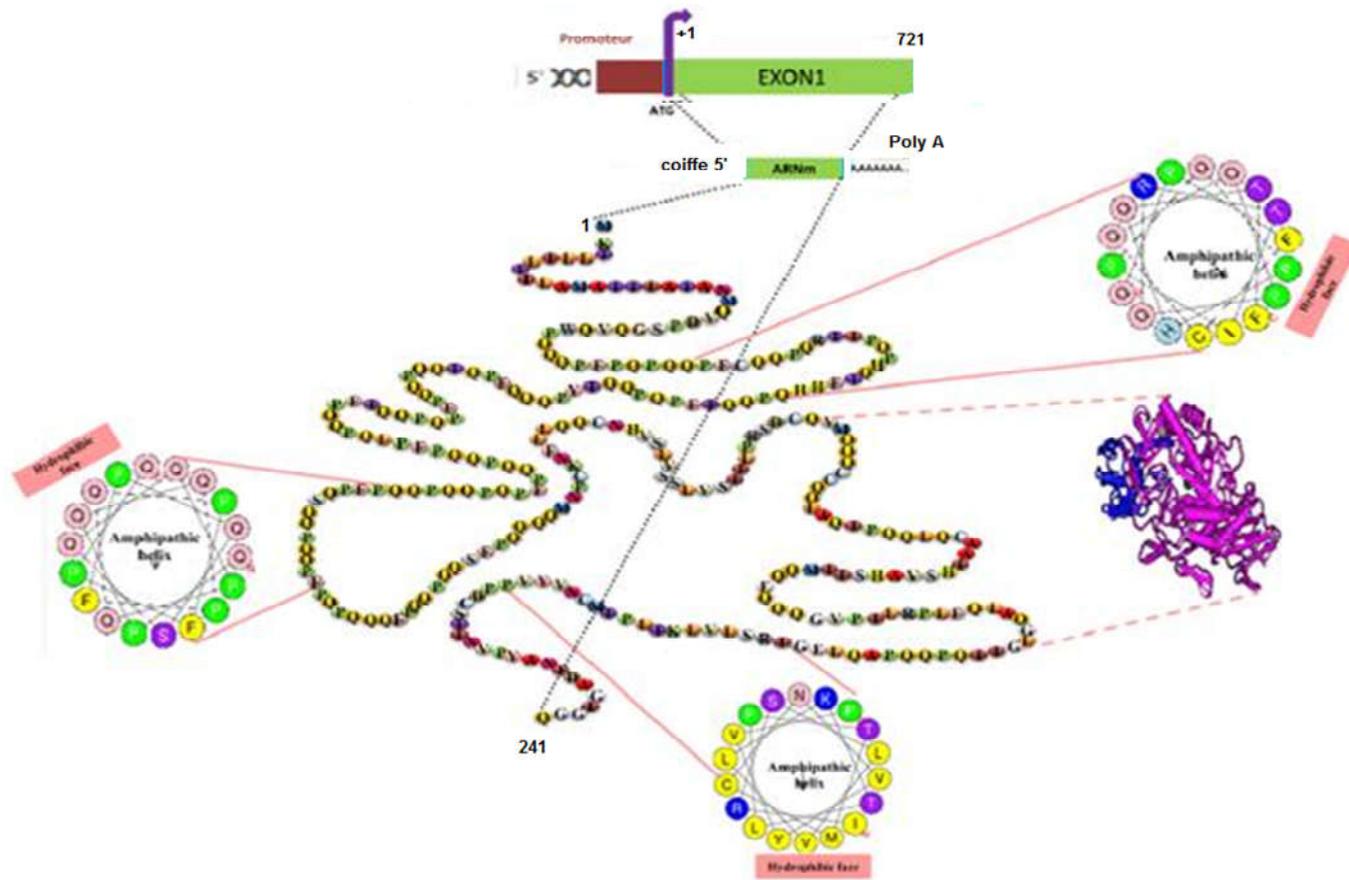
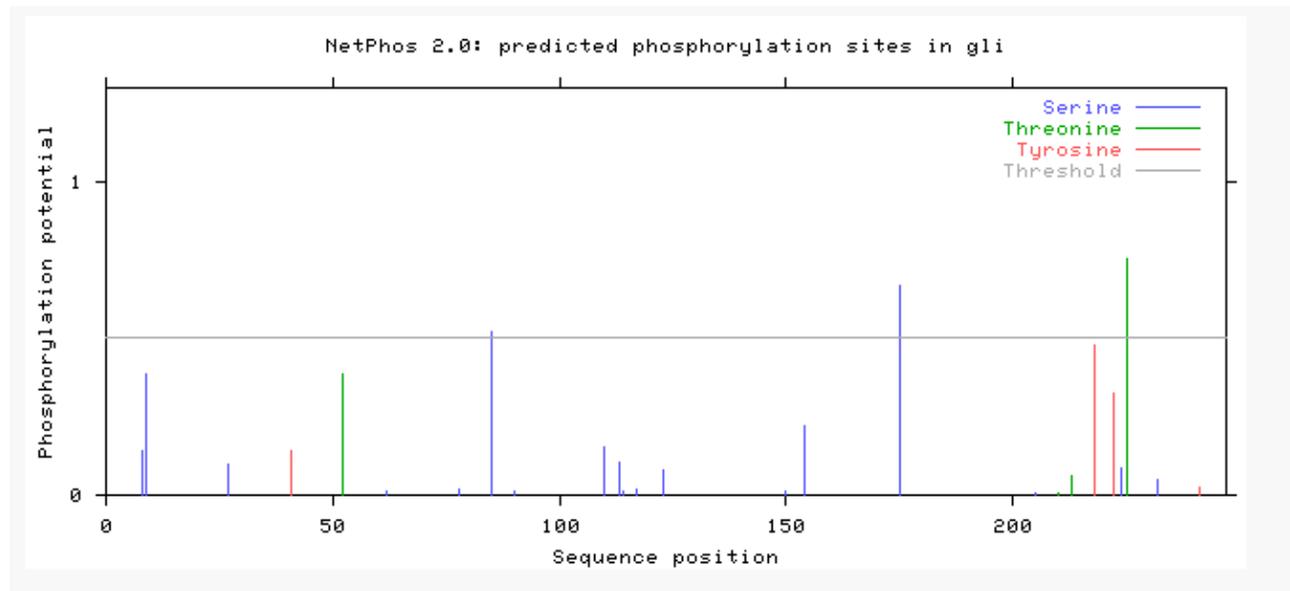


Fig. 5. Structure de la protéine γ -gliadine AAQ63864 et les différentes étapes de sa transcription

A



B

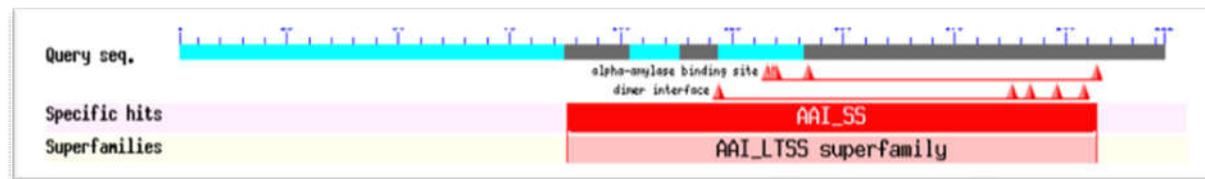


Fig.6. A. Les différents sites de phosphorylation de la protéine AAQ63864.

B. Domaines conservés de la protéine AAQ63864 selon CDD.

3. MATERIELS ET ME

THODES

3. 1 Les différentes bases de données (BD) consultées

Les BD suivantes : NCBI, GrainGenes (A database for Triticeae and Avena) (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>), Gramene (<http://www.gramene.org/>) et Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) ont été utilisées. La prospection a été effectuée par les mots clés : «gliadine», «*Triticum turgidum*» dans la commande « recherche » pour orienter la fouille. Une fois la source de séquences atteinte, leur saisie se réalise sous le format FASTA.

3. 2 Programmes et logiciels employés

La filtration des séquences complètes collectées est effectuée par le programme BLAST « Basic Local Alignment Search Tool » [28] et par le logiciel d'alignement ClutalX2.1. Le programme MEGA version 6.06 [26] (<http://www.megasoftware.net/>) est utilisé pour l'analyse phylogénétique. Le programme MEME : Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (<http://memesdsc.edu/meme/website/>) [29] permet de trouver des motifs communs à un ensemble de protéines appartenant à une même famille ou à des familles proches. Les paramètres optimisés du MEME sont employés comme suit : nombre des répétitions (size > 0 per sequence), nombre maximal de motifs (10 motifs) et la largeur optimale varie entre 6 et 50 résidus.

Les caractéristiques moléculaires et structurales sont analysées par des outils et des logiciels qui sont disponibles sur ExPASy (<http://www.ExPASy.Protparameters.Tools>). L'identification de la composition en acides aminés est réalisée par ProtParam (<http://www.ExPASy.org/Protparameters.Tools>) [30].

L'analyse de la structure secondaire est réalisée par PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) et par PSSfinder (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=pps&group=programs&subgroup=propt>).

Le programme d'analyse SUMOplot™ (<http://www.abgent.com/sumoplot/>) prédit les sites de sumoylation (<http://www.abgent.com/sumoplot/>). Afin de prédire l'existence de site de N-glycosylation, nous avons utilisé le programme NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

La prédiction de N-acétylation a été effectuée par un programme nommé NetAcet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>). Le serveur NetPhos 2,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) et le serveur NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) calculent des prédictions des sites de kinases spécifiques pour la phosphorylation des protéines. La recherche des domaines transmembranaires a été effectuée avec les programmes HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop>), TopPred2 (<http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2/>), Tmpred (<http://www.ch.eikmbnet.org>), PRED-TMR2 (<http://athina.biol.uoa.gr/PRED-TMR2/>) et PRED-TMR (<http://o2.biol.uoa.gr/PRED-TMR>).

Il est possible de prévoir la présence de domaines conservés dans la séquence protéique dans la banque CDD Conserved Domain Database de NCBI et ce, en utilisant le programme RPS blast (Reversed Position Specific Blast) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). La vérification de domaines conservées et la détermination de famille se font à l'aide d'InterProScan5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>) [31].

4. CONCLUSION

L'analyse moléculaire et structurale effectuée principalement à l'aide d'outils bioinformatiques constitue un prérequis indispensable pour comprendre la nature et la fonction de cette protéine. Cependant, la structure complexe de la gliadine que nous avons étudiée complique la détermination de sa fonction et de son rôle biologique, faisant alors appel à d'autres moyens tels que la surexpression de ce gène dans un système homologue ou, au contraire, la suppression de son expression et de suivre par la suite le phénotype obtenu. Néanmoins, le fait d'avoir étudié une gliadine isolée à partir de la variété de blé dur Iride, réputée pour sa haute qualité technologique, permet d'en faire un candidat intéressant à valoriser notamment en tant que marqueur moléculaire de qualité ou dans un programme d'amélioration génétique de la valeur nutritive du blé dur.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] International Grain Council (IGC), rapport de 1 août 2013 sur le marché des céréales.

<http://www.igc.int/en/Default.aspx>.

[2] Troccoli A, Borrelli GM, De Vita P, Fares C, Di Fonzo N. Durum wheat quality: A multidisciplinary concept. *Journal of Cereal Science*, 2000,. 32, 99-113.

doi:10.1006/jcers.2000.0322

[3] Patil R M, Oak MD, Tamhankar SA, Rao VS. Identification of gluten protein subunits and their PCR amplified products related to sedimentation volume in durum wheat. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 15, 47–50. doi:10.1007/BF03321901

[4] Nazco R, Villegas D, Ammar K, Pena RJ, Moragues M, Royo C. Can Mediterranean durum wheat landraces contribute to improved grain quality attributes in modern cultivars. *Euphytica*, 2012, 185, 1-17. doi: 10.1007/s10681-011-0588-6

[5] Edwards NM, Gianibelli MC, McCaig TN, Clarke JM, Ames NP, Larroque OR, Dexter JE, Relationships between dough strength, polymeric protein quantity and composition for diverse durum wheat genotypes. *J. Cereal. Sci.*, 2007, 45, 140-149. doi:10.1016/j.jcs.2006.07.012

[6] Shewry PR, Jones HD, Transgenic wheat: where do we stand after the first 12 years?. *Annals of Applied Biology*, 2005, 147, 1–14. doi: 10.1111/j.1744-7348.2005.00009.x

[7] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Vasil IK, Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nat. Biotechnol.*, 1996, 14, 1151–1159. doi: 10.1038/nbt0996-1155

[8] Blechl AE, Anderson OD. Expression of a novel highmolecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nat. Biotechnol.*, 1996,14, 875–879. doi:10.1038/nbt0796-875

[9] Gao X, Appelbee MJ, Mekuria GT, Chalmers KJ, Mather DE. A second 'overexpression' allele at the Glu-B1 high-molecular-weight glutenin locus of wheat: sequence characterization and functional effects. *Theor. Appl. Genet.*, 2012, 124(2), 333-43.

[10] Tosi P, D'Ovidio R, Napier JA, Bekes F, Shewry PR. Expression of epitope-tagged LMW glutenin subunits in the starchy endosperm of transgenic wheat and their incorporation into glutenin polymers. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 108, 468–476. doi: 10.1007/s00122-003-1459-x

[11] Tosi P, Masci S, Giovangrossi A, D'Ovidio R, D'Ovidio R, Bekes F, Larroque O, Napier J, Shewry PR. Modification of the low molecular weight (LMW) glutenin composition of

transgenic durum wheat: Effects on glutenin polymer size and gluten functionality. Mol. Breed., 2005, 16, 113–126. doi: 10.1007/s11032-005-5912-1

[12] Scossa F, Laudencia-Chingcuanco D, Anderson OD, Vensel WH, Lafiandra D, D'Ovidio R, Masci S. Comparative proteomic and transcriptional profiling of a bread wheat cultivar and its derived transgenic line overexpressing a low molecular weight glutenin subunit gene in the endosperm. Proteomics, 2008, 8, 2948-66. doi: 10.1002/pmic.200700861

[13] Darlington H, Fido R, Tatham AS, Jones H, Salmonc SE, Shewry PR. Milling and baking properties of field grown wheat expressing HMW subunit transgenes. J. Cereal Sci., 2003, 38, 301–306. doi:10.1016/S0733-5210(03)00034-1

[14] Shewry PR, Pastori GM, Békés F, Jones HD, Wheat transgenics: where are we now? In Cereals 2004, pp. 345–347. Eds K. Black, J.F. Panozzo and G.J. Roberts. North Melbourne, Australia: Royal Australian Chemical Institute.

[15] Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput. Appl. Biosci., 1992, 8, 275-282. doi:10.1093/bioinformatics/8.3.275

[16] Elouafi I, Nachit MM. A genetic linkage map of the Durum x *Triticum dicoccoides* backcross population based on SSRs and AFLP markers, and QTL analysis for milling traits. Theor. Appl. Genet., 2004, 108, 401-413. doi:10.1007/s00122-003-1440-8

[17] Damidaux R, Autran JC, Feillet P. Gliadin electrophoregrams and measurement of gluten viscoelasticity in durum wheats. Cereal Foods World, 1980, 25, 754-756.

[18] Joppa LR, Khan L, Williams ND. Chromosomal location of genes for gliadin polypeptides in durum wheat *Triticum turgidum* L. Theor. Appl. Genet., 1983, 64, 289-293. doi: 10.1007/BF00274164.

[19] Ruiz M, Vázquez JF, Carrillo JM, Genetic bases of grain quality. In: Durum wheat Breeding, current approaches and future strategies (Royo, C., Nachit, M. M., Di Fonzo, N., Araus, J. L., Pfeiffer, W. H., Slafer, G. A). Food Product Press, 2005, Volume 1, 349-375.

[20] Payne PI, Jackson EA, Holt LM. The association between γ gliadin 45 and gluten strength in durum wheat varieties: a direct causal effect of the result of genetic linkage? J. Cereal. Sci., 1984, 2, 73-81.

-
- [21] Shewry PR, D'Ovidio R, Lafiandra D, Jenkins J, Mills ENC, Békés F. Wheat grain proteins. In K Khan, PR Shewry, eds. *Wheat Chemistry and Technology*, Ed 4. AACC, St Paul, 2009, pp 223–298.
- [22] Gu YQ, Crossman CC, Kong X, Luo M, You FM, Coleman Derr D, Dubcovsky J, Anderson OD. Genomic organization of the complex a-gliadin gene loci in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109, 648-657. Doi:10.1007/s00122-004-1672-2
- [23] Qi PF, Wei YM, Ouellet T, Chen Q, Tan X, Zheng YL. The gamma-gliadin multigene family in common wheat (*Triticum aestivum*) and its closely related species. *BMC Genomics*, 2009, 10,168. doi : 10.1186/1471-2164-10-168
- [24] Piston F, Dorado G, Martin A, Barro F. Cloning of nine gamma-gliadin mRNAs (cDNAs) from wheat and the molecular characterization of comparative transcript levels of gamma-gliadin subclasses. *J. Cereal Sci.*, 2006, 43 (1), 120-128. doi: 10.1016/j.jcs.2005.07.002
- [25] Shade RE, Schroeder HE, Pueyo JJ, Tabe LM, Murdock LL, Higgins TJV, Chrispeels MJ. Transgenic Pea Seeds Expressing the α -Amylase Inhibitor of the Common Bean are Resistant to Bruchid Beetles. *Nature Biotechnology*, 1994, 12, 793-796. DOI: 10.1038/nbt0894-793
- [26] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25, 4876-4882.
- [27] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30, 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- [28] Altschul M, Simpson KW, Dykes NL, Mauldin EA, Reubi JC, Cummings JF. Evaluation of somatostatin analogues for the detection and treatment of gastrinoma in a dog. *J. Small Anim. Pract.*, 1997, 38, 286-291. doi: 10.1111/j.1748-5827.1997.tb03466.x
- [29] Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, W202-208. doi: 10.1093/nar/gkp335
- [30] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A.

Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 2005, pp. 571-607.

[31] Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong SY, Lopez R, Hunter S. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 2014, 30 (9), 1236-40. doi:10.1093/bioinformatics/btu031

How to cite this article:

Mzid R, Ayadi M, Ben Ayed R, Menzli E, Babay E, Hanana M. Molecular characterization of γ gliadin from durum wheat (*triticum turgidum l. subsp. durum* ((desf.) husn.)). *J. Fundam. Appl. Sci.*, 2017, 9(3), 1497-1518.