

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR- ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En BIOCHIMIE

Option : Biochimie appliquée

THEME

Contribution à l'étude des protéines allergènes hydrosolubles de l'arachide

Présentée par : BOUALEG Imène

Directeur de thèse : M, Boutebba. A Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury :

Président : M, Saka. S Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : Mme, Benbouzid. H Maître de conférences A, Université d'Annaba
Mme, Hennouni. N Maître de conférences A, Université d'El-Tarf
M, Boumendjel. M Maître de conférences A, Université d'El-Tarf

Année universitaire : 2017/2018

*A mon **Dieu** en qui j'ai toujours cru et en qui je croirai toujours.*

A la mémoire de mes très chères grandes mères.

*À ma très chère mère **Fatiha** et à mon très cher père **Ramadan** qui m'ont tout donné et qui m'ont comblé d'amour et de tendresse.*

*A mes chers frères **Seif Eddine** et **Achraf** et à mon adorable sœur **Khalida** pour leur soutien et leurs encouragements.*

*A mon oncle **Bouabdallah**.*

A toute ma famille maternelle et paternelle.

*A mes amies **Imèn** et **Mouna**.*

*A mes camarades **Hayette**, **Rym**, **Hanene**, **Nabila**, **Badra**, **Amina** et **Imen**.*

IMENE

Remerciements

*Mes premiers remerciements vont à mon Directeur de thèse Monsieur le professeur **Boutebba Aïssa** pour son encadrement scientifique, sa rigueur, ses précieux conseils et sa patience. Que ce travail vous exprime ma vive gratitude et mon grand respect.*

*Je remercie sincèrement Monsieur **Paulo Marcelo** pour l'accueil au sein de la plateforme Ingénierie Cellulaire et Analyses des Protéine (ICAP), Université de Picardie Jules Verne- Amiens, pour son aide, l'intérêt accordé à mes travaux et sa gentillesse.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur le professeur **Saka Saad** pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.*

*Je tiens à remercier aussi les membres de jury, les maîtres des conférences A Madame **Benbouzid Hounèïda**, Madame **Hennouni Nacera** et Monsieur **Boumendjel Mahi. Eddine** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie vivement Madame **Benmostefa Zoubèïda** pour son aide lors de la correction de mon article scientifique.*

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Je teins à exprimer mes sincères gratitudes à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dans ce travail, il est étudié la fraction protéique hydrosoluble de l'arachide crue et grillée. Pour les dosages, il est utilisé la méthode de Kjeldhal $P (\%) = N (\%) \times 6,25$ et celle de Bradford. Pour l'identification des protéines et des composés protéiques immunoréactifs, la purification et le fractionnement, il est employé l'électrophorèse bi- et mono-dimensionnelle, les immunoempreintes (1D), la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et l'interrogation de la base de données Uni-Prot, la chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75 et la chromatographie sur gel de DEAE-Cellulose échangeuse d'anions. Les teneurs en protéines totales, insolubles et solubles dans l'eau sont consécutivement 45,49 %, 36,65 % et 9,99 %. Il est identifié l'Ara h1, l'Ara h2, l'Ara h3 et l'Ara h6. Les entités moléculaires mises en évidence sont caractérisées par des Mr faibles et des pHi acides ou neutres. L'isoforme P41B (Ara h1) et la conarachine monomère de l'Ara h1 sont résistants au grillage à 140°C pendant 40 min. Contrairement à la glycine (Ara h3) et à la conglutine (Ara h6), l'isoforme P17 (Ara h1) et la conglutine-7 (Ara h2) sont sensibles au traitement thermique appliqué. L'isoforme P41B et la conarachine sont sources d'allergie. Les peptides solubilisés provenant de la protéolyse naturelle de l'Ara h2 ne renferment pas les épitopes permettant la liaison IgEs-Ara h2. Il est démontré que les séquences peptidiques NNF~~G~~KLFEVK et NEGVIV~~K~~SKEHVEELTKHAKSVSK, SSDNEGVIVK et REREEDWRQP sont successivement les épitopes de l'isoforme P41B, de la conarachine et de l'isoforme P41B et la conarachine. Ces variants antigéniques ne sont pas dégradés par le grillage de l'arachide à 140°C pendant 40 min. Ce processus n'a pas d'effet sur l'allergénicité de l'isoforme P41B et la conarachine.

Mots clés : Arachide, Crue, Protéines hydrosolubles, Electrophorèse bi- et mono-dimensionnelle, Grillage, Immunoempreintes (1D), Spectrométrie de masse, Purification, Fractionnement, Albumines 2S

In this work, the water-soluble protein fraction of raw and roasted peanut was studied. For the assays, the Kjeldahl method $\% P = N \times 6, 25$ and that of Bradford were studied. For the identification of proteins and immunoreactive protein compounds, purification and fractionation, the two (2D) and mono-dimensional (1D) electrophoresis, immunoblots (1D), mass spectrometry (LC-MS / MS) and Uni-Prot database, gel filtration chromatography on Sephadex G-75 and anion exchange chromatography on DEAE-Cellulose were used. The total, insoluble and water-soluble protein contents were consecutively 45.49 % and 36.65 % and 9.99 %. It was identified the Ara h1, Ara h2, Ara h3 and Ara h6. The molecular entities shown were characterized by a low molecular weight and acidic or neutral pHi. The isoform P41B (Ara h1) and conarachin the monomer of Ara h1 were resistant to roasting at 140 °C for 40 min. Unlike to glycinin (Ara h3) and conglutin (Ara h6), the isoform P17 (Ara h1) and the conglutin-7 (Ara h2) were sensitive to this treatment. The isoform P41B and conarachin were sources of allergy. The solubilized peptides derived from the natural proteolysis of Ara h2 do not contain epitopes allowing the IgEs-Ara h2 binding. It was demonstrated that NNFGKLFVK and NEGVIVKSKEHVEELTKHAKSVSK, SSDNEGVIVK and REREEDWRQP were successively the epitopes of isoform P41B, conarachin and the isoform P41B and conarachin. These antigenic variants were not degraded by roasting of peanut at 140 °C for 40 min. This process has no effect on the allergenicity of the isoform P41B and conarachin.

Key words: Peanut, Raw, Water-soluble proteins, two-and one-dimensional electrophoresis, Roasting, Immunoblotting (1D), Mass spectrometry, Purification, Fractionation, 2S albumins

الملخص

في هذا العمل، قد درس الجزء البروتيني القابل للذوبان في الماء للقول السوداني الخام والمحمص من أجل فحص نسبة البروتين، لقد درست طريقة كيلدال $P = N \times 6, 25$ % و برادفورد. للتعرف على البروتينات والمركبات البروتينية المتفاعلة مناعياً، التنقية والفصل، تم استخدام الرحلان الكهربائي ثنائي (D2) وأحادي البعد (D1)، و النسخ البروتيني المناعي أحادي البعد (D1)، مطياف الكتلة (LC-MS / MS) وقاعدة البيانات Uni-Prot، التحليل الكروماتوغرافي على هلام الترشيح Sephadex-75 و التحليل الكروماتوغرافي بالتبادل الشاردي على هلام DEAE-Cellulose. نسبة البروتينات الكلية، غير قابلة للذوبان والقابلة للذوبان في الماء هي على التوالي 45.49%، 36.65% و 9.99%. تم التعرف على Ara h1، Ara h2، Ara h3 و Ara h6. تتميز الجزيئات المتحصل عليها بأوزان جزيئية ضعيفة و نقاط تكافؤ الحموضة حمضية أو متعادلة. ال isoforme P41B (Ara h1) و conarachine الشكل الأحادي لل Ara h1 مقاومين للتحميص في درجة حرارة 140° م خلال 40 دقيقة. على عكس ال (glycinine) Ara h3 وال (conglutine Ara h6)، ال isoforme P17 (Ara h1) و ال (Ara h2) conglutine-7 حساسين للعلاج المطبق. ال isoforme P41B و conarachine هما مسببا الحساسية. البيبتيدات الذائبة في الماء الناتجة عن التحليل البروتيني الطبيعي لل Ara h2 لا تحوي محددات تسمح بالرابطة IgEs-Ara h2. يتبين أن REREEDWRQP، SSDNEG VIVK، NEG VIVKSKEHVEELTK HAKSVSK و NNFGKLFVK، هي على التوالي محددات ل isoforme P41B، و ل conarachine، و ل isoforme P41B و ال conarachine. معاً. هذه المتغيرات لم يتم تفككها بتحميص الفول السوداني في درجة حرارة 140° م خلال 40 دقيقة. هذه العملية ليس لها تأثير على ال isoforme P41B و ال conarachine.

كلمات البحث: الفول السوداني، خام، بروتينات قابلة للذوبان في الماء، الترحيل الكهربائي ثنائي و أحادي البعد، التحميص، النسخ البروتيني المناعي، مطياف الكتلة، تنقية، فصل، ألبومين 2S

Liste d'abréviations

Abréviations	Significations
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ICBAA	Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaires
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
SDS-PAGE	Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en Sodium Dodécylsulfate
IEF	Iso-électrolocalisation
KDa	Kilo Dalton
Mr	Masse moléculaire relative
pHi	pH-isoélectrique
1D/2D	1 Dimension/ 2 Dimension
Ve	Volume d'éluion
V _o	Volume mort
LC	Chromatographie Liquide
MS	Spectrométrie de Masse
SAB	Sérum Albumine Bovine
DEAE	Diéthylaminoethyle
DTT	Dithiothreitol
TBS-T	Tris-Buffered Saline-Tween
SDS	Dodécylsulfate de Sodium
ECL	Enhanced Chemiluminescence substrate

Liste d'abréviations

CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-Propanesulfonate
NaCl	Chlorure de sodium
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonate d'ammonium
CaCl ₂	Chlorure de calcium
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

Figure N° 1: Classification de Gell et Coombs	4
Figure N°2: Classification des réactions adverses des aliments	5
Figure N° 3: Représentation schématique du FcεRI	9
Figure N° 4: Phase de sensibilisation de l'allergie dépendante des IgE	10
Figure N° 5: Fixation d'antigène sur les IgE fixés sur les mastocytes.....	12
Figure N° 6: Signalisation intracellulaire via le FcεRI aboutissant à la dégranulation des mastocytes et des basophiles	12
Figure N° 7: Phase effectrice de l'allergie dépendante des IgE	13
Figure N° 8: Schéma des épitopes linéaires et conformationnels	15
Figure N° 9: Fréquence des aliments allergéniques chez l'enfant et chez l'adulte	17
Figure N° 10 : Modèle moléculaire du trimère de l'Ara h1	23
Figure N° 11: Modèle en ribbon de l'Ara h2	23
Figure N° 12: Modèle moléculaire de l'Ara h3	23
Figure N° 13: Modèle en ribbon de l'Ara h6	24
Figure N° 14: Modèle en ribbon de l'Ara h5	24
Figure N° 15: Modèle en ribbon de l'Ara h8	24
Figure N° 16: Modèle en ribbon de l'Ara h9	24
Figure N° 17: Processus de la digestion trypsique des trophallergènes	27
Figure N° 18: Etapes d'identification des trophallergènes.....	28
Figure N° 19: Diagramme d'extraction des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide	31
Figure N° 20: Courbe d'étalonnage pour la mesure de la concentration en protéines hydrosolubles	33
Figure N° 21: Courbe de tendance des protéines témoins éluées par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75.....	38
Figure N° 22: Taux de protéines totales, de protéines non hydrosolubles et de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide	41
Figure N° 23: Carte de protéines hydrosolubles séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D) sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate de la farine d'arachide crue.....	42
Figure N° 24 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 23 (Score : 1643,84) de l'isoforme P41B de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue	43

Liste des figures

- Figure N° 25 :** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 21 (Score: 278,08) de l'isoforme P17 de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue.....43
- Figure N° 26 :** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 17 (Score: 62,26) de la conarachine monomère de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue44
- Figure N° 27:** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 2 (Score: 1607,87) de la Gly 1 fragment d'Ara h3 (globuline 11S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue45
- Figure.N° 28:** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 28 (Score: 130,74) de l'arachine Ahy-3OS fragment d'Ara h3 (globuline 11S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue45
- Figure N° 29 :** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 5 (Score: 74,77) de l'Ara h2 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue46
- Figure N° 30:** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 11 (Score: 454,49) de l'Ara h6 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue46
- Figure N° 31:** Diagramme des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)49
- Figure N° 32 :** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 1 (Score: 1129,79) de l'isoforme P17 de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue50
- Figure N° 33:** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 8 (Score: 2419,83) de l'isoforme P41B de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue50
- Figure N° 34 :** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 7 (Score: 19688,77) de la conarachine monomère de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue.....51
- Figure N° 35:** Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 19 (Score: 246,73) de l'arachine Ahy 3-OS fragment d'Ara h3 (globuline 11S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue.....52

Liste des figures

Figure N° 36 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 22 (Score: 342,44) de l'Ara h2 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue.....	53
Figure N° 37: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 23 (Score: 937,799) de l'Ara h6 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue.....	53
Figure N° 38: Diagrammes des protéines hydrosolubles d'arachide crue et grillée séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE).....	57
Figure N° 39: Immunoempreintes (1D) des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue	59
Figure N° 40: Alignements des séquences en acides aminés des isoformes P41B et P17 de l'Ara h1	65
Figure N° 41: Alignements des séquences en acides aminés de l'isoforme P41B de l'Ara h1 et la conarachine monomère de l'Ara h1	66
Figure N° 42: Profil d'élution de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue obtenu par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75.....	73
Figure N° 43 : Fractionnement des isoformes d'albumines 2S de l'arachide crue par chromatographie sur résine échangeuse d'anion DEAE-Cellulose	74

Tableau N° 1 : Principales réactions croisées chez l'enfant	7
Tableau N° 2: Protéines allergènes de l'arachide répertoriées par International Union of Immunological Societies (IUIS).....	22
Tableau N° 3: Protéines non-hydrosolubles de l'arachide identifiées comme allergènes nouveaux	26
Tableau N° 4: Gamme d'étalonnage réalisée avec le Sérum d'Albumine Bovine (S.A.B).....	33
Tableau N° 5: Protéines témoins utilisées pour la chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75	38
Tableau N° 6: Protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D) et identifiées par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot	47
Tableau N° 7 : Identification des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse monodimensionnelle (1D) sur gel de polyacrylamide (TGX-12) en sodium dodécylsulfate par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot	55
Tableau N° 8: Identification des protéines hydrosolubles de l'arachide grillée à 140°C pendant 40 min par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot.....	58
Tableau N° 9: Protéines allergènes de la fraction hydrosoluble de la farine délipidée d'arachide crue identifiées par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot	60
Tableau N° 10: Séquences en acides aminés des peptides des protéines allergènes déterminées de l'arachide crue.	61
Tableau N° 11: Peptides distinctifs mis en évidence de l'isoforme P41B et de la conarachine par rapport à l'isoforme P17	67
Tableau N° 12: Peptides identifiés dans les bandes immunoréactives de l'isoforme P41B et de la conarachine	68
Tableau N° 13: Séquences en acides aminés des épitopes linéaires connus de l'allergène Ara h1 d'arachide.....	70
Tableau N° 14: Peptides identifiés de l'isoforme P41B et de la conarachine dans les bandes immunoréactives mises en évidence après grillage de l'arachide à 140°C pendant 40 min.....	71

- **Liste des abréviations**
- **Liste des figures**
- **Liste des tableaux**

Introduction	1
I-Recherche bibliographique	3
I-1- Allergie alimentaire	3
I-2- Mécanisme de l'allergie alimentaire	8
I-3- Allergènes alimentaires	11
I-4- Caractéristiques générales des trophallergènes	14
I-5- Procédés pour la réduction de l'allergénicité de protéines alimentaires	16
I-5-1- Procédés thermiques	16
I-5-2- Procédés enzymatiques.....	18
I-6- Facteurs non thermiques modifiant l'allergénicité des protéines : germination, pH, irradiation aux rayons γ et fermentation.....	18
I-7-Légumineuses sources d'allergénicité consommées dans l'alimentation humaine	19
I-8- Allergie à l'arachide	20
I-9- Allergènes de l'arachide	21
I-10- Identification des isoallergènes	25
II-Matériel et méthodes d'analyses	29
II-1- Matériel biologique	29
II-2- Méthodes d'analyses	29
II-2-1- Délipidation de la farine d'arachide et préparation de l'échantillon.....	29
II-2-2- Détermination du taux de protéines totales de la farine délipidée de l'arachide	29

II-2-3- Extraction des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide	30
II-2-4- Détermination du taux de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide	32
II-2-5- Détermination du taux de protéines non hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide	32
II-2-6- Séparation des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue par électrophorèse bidimensionnelle (2D) sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)	32
II-2-7- Séparation des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue par électrophorèse monodimensionnelle (1D) sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)	34
II-2-8- Extraction et séparation des protéines hydrosolubles de l'arachide grillée à 140°C pendant 40 minutes par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE).....	34
II-2-9- Immunoempreintes des composés protéiques hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue	35
II-2-10-Identification des protéines séparées par électrophorèse bi et monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate et des composés protéiques immunoréactifs de la farine délipidée d'arachide	35
II-2-10-1- Digestion trypsique des protéines	35
II-2-10-2- Identification des protéines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)	36
II-2-10-3- Recherche des protéines allergènes dans la base de données Uni-Prot.....	36
II-2-11- Purification de la fraction protéique hydrosoluble de la farine délipidée d'arachide crue.....	37
II-2-11-1- Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75	37
II-2-11-2-Détermination des masses moléculaires relatives des fractions collectées par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75.....	37

II-2-12- Fractionnement des protéines de la fraction hydrosoluble purifiée par chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Cellulose	37
III- Résultats et discussion	40
III-1- Analyse des taux de protéines de la farine délipidée d'arachide	40
III-2- Analyse protéomique pour déterminer les protéines de pHi acides à neutres de la fraction hydrosoluble de la farine délipidée d'arachide crue	40
III-3- Analyse des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE).....	48
III-4- Effet du grillage sur la résistance ou la sensibilité des protéines hydrosolubles d'arachide	54
III-5- Détermination des protéines allergènes hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue	56
III-6- Prédiction des épitopes de l'isoforme P41 B et la conarachine reconnus par les IgE spécifiques	64
III-7- Purification des protéines hydrosolubles d'arachide crue par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75	72
III-8- Fractionnement des protéines d'albumines 2S purifiées par chromatographie sur résine échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Cellulose.....	72
Conclusion	76
Références bibliographiques	77

Introduction

Introduction

Les protéines d'origine végétale occupent une grande part dans l'alimentation humaine même si elles ont une valeur biologique moins importante que celles provenant de sources animales. Cependant, des protéines dites allergènes sont capables de provoquer des réactions immunologiques indésirables chez les individus atopiques. Elles sont généralement hydrosolubles ou solubles dans les solutions salines diluées et rarement dans l'alcool (**Traidl-Hoffmann et al., 2009**). La plupart des protéines allergènes alimentaires sont des glycoprotéines de faibles masses moléculaires variant de 2 à 100 kDa et de pH-isoélectriques distribués de l'acide au basique (**Thomas et al., 2005 ; Aalberse, 2000**). Elles sont résistantes aux protéases et à l'action de la chaleur (**Moneret-Vautrin., 1997**). Certaines possèdent des domaines répétitifs capables de former des oligomères et une tendance à s'agréger (**Breiteneder et Mills, 2005**). Elles renferment des portions constituées de segments linéaires contigus d'acides aminés impliquées dans les liaisons avec les IgE spécifiques même après dénaturation des protéines. Ces séquences peuvent ne pas être reconnues au sein de la macromolécule native pour des raisons stériques. Elles ont aussi des motifs de conformations tridimensionnelles qui réticulent avec les anticorps des personnes sensibles. Ces configurations disparaissent après la dégradation de la structure spatiale. En général, les épitopes des trophallergènes majeurs sont linéaires (**Sathe et Sharma, 2009 ; Lee et Burks, 2006**). Ceux fixant les IgG et les IgE ont des séquences d'acides aminés communes ou distinctes (**Cooke et Sampson, 1997**). L'analyse qualitative ou quantitative des trophallergènes nécessite une séparation des différents isoformes ou glycoformes, des sous-unités peptidiques et des constituants générés par le processus protéolytique (**Chassaigne et al., 2009**). Les isoformes protéiques peuvent être détectés par électrophorèse bidimensionnelle et identifiés par spectrométrie de masse (**Larsen et Roepstorff, 2000; Mann et Jensen, 2003; Jensen, 2004**). Le petit nombre de familles de protéines végétales décrit comme source d'allergénicité tel les cupines, les prolamines, les pathogenesis-related proteins et la profiline et la distribution étroite de la plus part de ces molécules (**Breiteneder et Radauer., 2004 ; Radauer et al., 2008**) suggèrent qu'il existerait d'autres protides allergisants et des facteurs non encore déterminés responsables d'allergie alimentaire. Parmi les légumineuses, l'arachide constitue l'une des principales causes des

réactions allergiques. Cette denrée induit des sensibilisations allergiques chez 8% des enfants et 2% des adultes (**Sicherer, 2001; Sicherer et al., 2010; Sicherer et Sampson, 2014**). Plusieurs allergènes de ce produit sont répertoriés par l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie (www.allergome.org). Les traitements physiques comme le grillage et la cuisson à l'eau appliqués à cet aliment ont des incidences variables sur la stabilité ainsi que l'allergénicité des protéines (**Beyer et al., 2001; Maleki et al., 2000**).

C'est dans ce contexte de protéines d'arachide que s'inscrit ce travail consacré à l'identification des protéines hydrosolubles de pH acides et neutres de cette denrée et détermination de leur immunoréactivité et leur comportement vis-à-vis au grillage ainsi que leur purification et le fractionnement des albumines 2S.

Recherche Bibliographique

I-Recherche bibliographique

I-1- Allergie alimentaire

Le terme « allergie » est défini par Von Pirquet en 1906 comme la capacité de l'organisme à réagir spécifiquement à une substance après sensibilisation antigénique (**Jaffuel et al., 2001; Dubuisson et al., 2002**). Elle est actuellement définie de manière plus restreinte comme une maladie suite à une réponse du système immunitaire à un antigène inoffensif. Elle constitue une des classes de réponses immunitaires appelées réactions d'hypersensibilités (**Mondoulet, 2005**). Ces dernières sont réparties en quatre catégories par Gell et Coombs (1963) : immédiate médiée par les IgE (type I), cytotoxique (type II), semi-tardive à complexe immuns (type III) et retardée à médiation cellulaire (type IV) (**Blanc, 2008**). La classification de Gell et Coombs donnée dans la figure N° 1 bien qu'ancienne, fait encore référence (**Gérald, 2011**). La réaction d'hypersensibilité de type 1 appelée immédiate ou anaphylaxie (**Béraud, 2001**) est souvent impliquée dans le cas de l'allergie alimentaire. Elle est la plus fréquente et rapide. Les symptômes apparaissent quelques minutes après l'exposition à l'allergène (**Gérald, 2011; Quevauvilliers et Fingerhut, 2001**). Elle a pour origine l'activation par un antigène spécifique de mastocytes sensibilisés par des IgE aboutissant à la libération des médiateurs chimiques de l'inflammation (**Mondoulet, 2005**). Le terme « atopie » est introduit pour définir un groupe de maladies comprenant les pathologies allergiques fréquentes. La caractéristique essentielle de l'atopie est la prédisposition génétique à développer une réponse immunitaire de type IgE à de faibles concentrations d'allergènes lors d'une exposition naturelle (**Sabbah, 1994**). Elle est modulée généralement par des facteurs génétiques, environnementaux et autres éléments impliquant la grande perméabilité des muqueuses gastro-intestinale et buccale aux antigènes (**De Franco et al., 2009; Sabbah, 1994; Blanc, 2008**). Les réactions à un aliment peuvent être toxiques et non. Parmi les réactions non toxiques, il est distingué l'allergie de l'intolérance. La figure N° 2 montre la classification des réactions adverses des aliments (**Manfred et Moll, 2000**). L'intolérance alimentaire est relativement fréquente chez l'enfant pendant la première année de sa vie (**Chapel et al., 2004**). Elle implique toute réponse physiologique anormale non immunologique à un produit

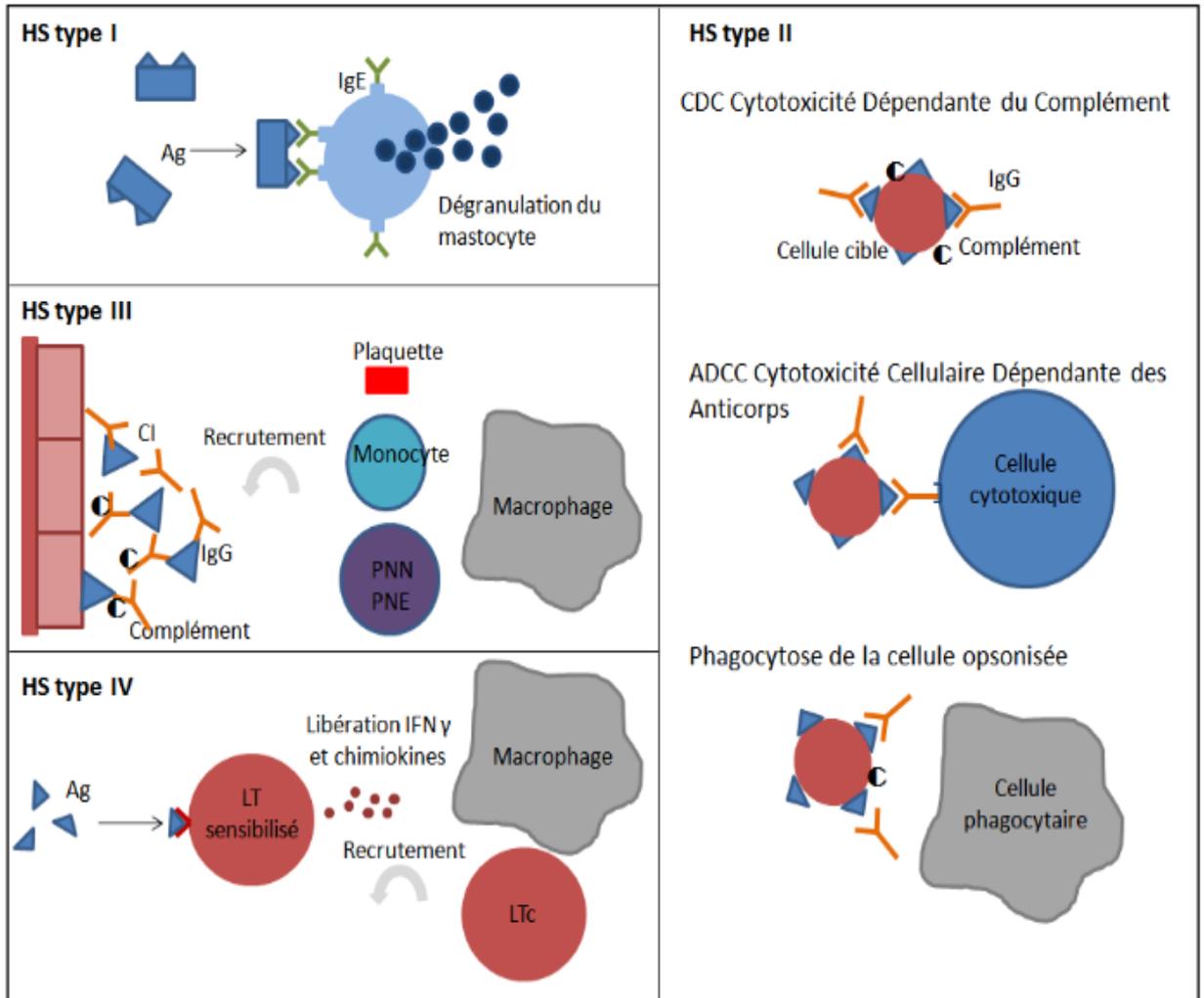


Figure N° 1: Classification de Gell et Coombs (Chum, 2015)

HS : Hypersensibilité, **Ag** : Antigène, **CI** : Complexe Immune, **LT** : Lymphocyte T,
LTc: Lymphocyte T cytotoxique, **C** : Complément

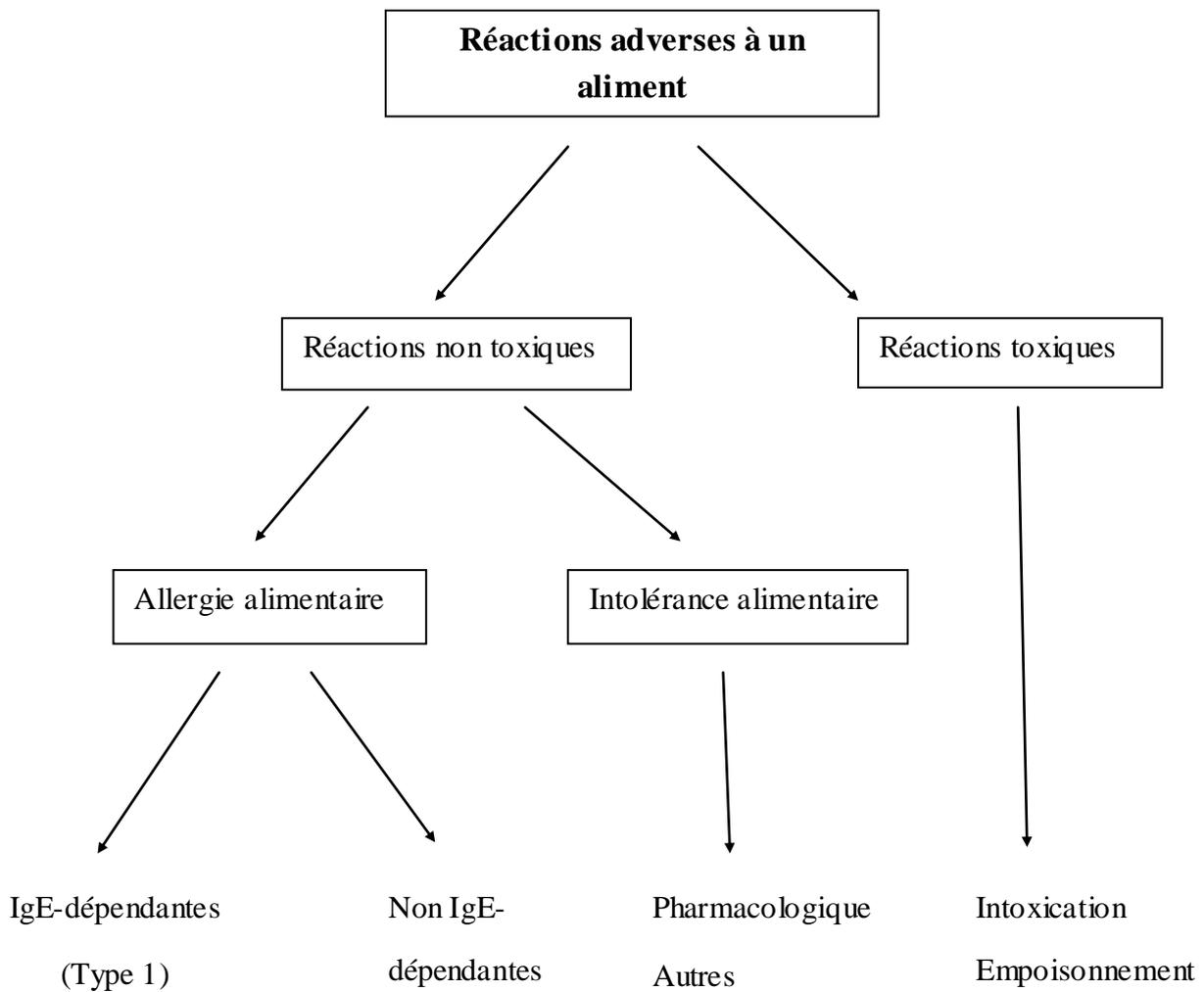


Figure №2: Classification des réactions adverses des aliments

(Manfred et Moll., 2000)

ou à un additif alimentaires médiée par un effet idiosyncrasique, pharmacologique ou métabolique. Elle est généralement le résultat d'un déficit enzymatique intestinal dont le plus répandu est celui en lactase (**Lifrani, 2006**). La fausse allergie alimentaire survient également après ingestion d'un aliment. Elle présente des manifestations cliniques très proches de l'allergie vraie. Il ne s'agit pas d'un mécanisme immuno-allergique car les manifestations sont liées à la prise d'aliments riches en histamine, des amines tel la tyramine et des substances histamino-libératrices activant les mastocytes par un mécanisme non allergique (**Dubuisson et al., 2002 ; Martin et al., 2006 ; Sabbah, 1994**). L'allergie alimentaire vraie correspond à des manifestations cliniques apparaissant après l'ingestion d'un trophallergène. Elle implique un mécanisme IgE dépendant chez un individu génétiquement prédisposé (atopique) (**Dubuisson et al., 2002**). Il existe des allergies croisées déclenchées par des allergènes différents de ceux ayant provoqués la sensibilisation de l'individu. Elles ont pour origine une similitude immunochimique entre des protéines provenant d'espèces différentes (**Branger et al., 2007**). Elles correspondent à la reconnaissance par un même anticorps d'un épitope commun à deux molécules. Il y a un degré d'homologie entre les deux protéines. Ce variant antigénique commun se trouve dans deux molécules de structures et de fonctions semblables ou non apparentées moins fréquemment. Concrètement, l'existence d'une telle réaction in vivo signifie que la dégranulation des mastocytes est déclenchée par une molécule différente de l'allergène initial responsable de la phase de sensibilisation (**Vuitton, 1997**). La démonstration de ce phénomène est basée sur l'inhibition de la fixation de l'allergène X sur l'IgE spécifique anti-X par une autre molécule Y également reconnue par l'IgE anti-X mais avec une affinité plus faible. Cette réaction est évaluée in vitro en mesurant directement la capacité d'un immunosérum à reconnaître différentes populations antigéniques en contrôlant que cet antisérum avant immunisation ne reconnaît pas ces populations antigéniques ou de déterminer la capacité de ces populations antigéniques à déplacer la fixation de l'allergène homologue sur son anticorps (RAST, ELISA, Immunoblot) (**Lifrani, 2006**). Les allergies croisées les plus connues sont : aliments/pneumallergènes, aliments/latex, aliments/aliments. Le tableau N° 1 donne les principales réactions croisées chez l'enfant (**Høst et al., 2005**).

Tableau N° 1 : Principales réactions croisées chez l'enfant (Høst et al., 2005)

Allergènes	Allergènes croisés fréquents
Pollens de bouleau	Pomme, noisette, carotte, céleri, cerise, poire, autres
Armoise	Céleri, carotte, fenouil, persil, coriandre, moutarde
Pollens de graminées	Pomme de terre, tomate, blé
Lait de vache	Lait de chèvre, lait de brebis, bœuf
Arachide	Fruit à coque, soja, haricot, petits pois, lentilles

I-2- Mécanisme de l'allergie alimentaire

Le mécanisme de la réaction allergique immédiate IgE dépendante de type I comporte la phase de sensibilisation et la réaction allergique proprement dite. La phase de sensibilisation se traduit par la production d'IgE spécifiques à la suite d'un premier contact avec l'antigène. Les IgE sont la dernière classe d'immunoglobulines synthétisées par les lymphocytes B et les plasmocytes. Elles sont constituées par l'assemblage de deux chaînes lourdes (H) comprenant un domaine variable et quatre domaines constants (C ϵ 1, 2, 3, 4) (chaînes ϵ) et deux chaînes légères (L) du même type (κ ou λ) (**Paupé et al., 1994**). Elles ont une masse moléculaire relative (Mr) de 188 kDa. Elles comportent une proportion importante de résidus glucidiques (12%). Les chaînes de type κ représentant les deux tiers des molécules d'IgE ont un P.M de l'ordre de 190 000. Elles sont thermolabiles et détruites par chauffage à 56°C (**Letonturier, 2001**). Il y a les récepteurs de haute affinité Fc ϵ RI et de basse affinité Fc ϵ RII (CD23) (**Bach et Chatenoud, 2002**). Elles se répartissent dans l'ensemble de l'organisme via la circulation sanguine. Elles se fixent sur des « cellules cibles » de la peau et des muqueuses (mastocytes) ainsi que sur des « cellules cibles » circulantes (granulocytes basophiles) par leur fragment Fc ce qui permet une prolongation de la demi-vie des IgE qui peut aller jusqu'à 12 semaines. Le site de liaison des IgE à leur récepteur (Fc ϵ RI) se situe dans le domaine C ϵ 3 et à la jonction C ϵ 2-C ϵ 3. La figure N° 3 est une représentation schématique du Fc ϵ RI (**Blank et al., 2003**). La production des IgE spécifiques dépend directement de l'interaction entre les cellules B et T et notamment de la production d'IL-4 (interleukine 4), IL5 (interleukine 5) et d'IL-13 (interleukine 13) par les cellules T auxiliaires de type 2 (TH2). La figure N° 4 révèle la phase de sensibilisation de l'allergie dépendante des IgE (**Chum, 2015**). Les cytokines sont responsables de la commutation isotypique vers les IgE. L'induction d'une réponse TH2 dépend de nombreux facteurs comme la prédisposition génétique, l'environnement et l'hygiène. Cette première étape dite phase de sensibilisation muette cliniquement prépare l'organisme à réagir de façon immédiate lors d'un second contact avec l'allergène (**Genetet, 2002; Dubuisson et al., 2002 ; Mondoulet, 2005**). Par rapport à la réaction allergique proprement dite, l'allergène est reconnu par les IgE fixées sur les récepteurs membranaires RFc ϵ I des mastocytes et des basophiles. Il se fixe par deux épitopes distincts sur deux IgE présentes à la surface membranaire créant ainsi un pontage des IgE.

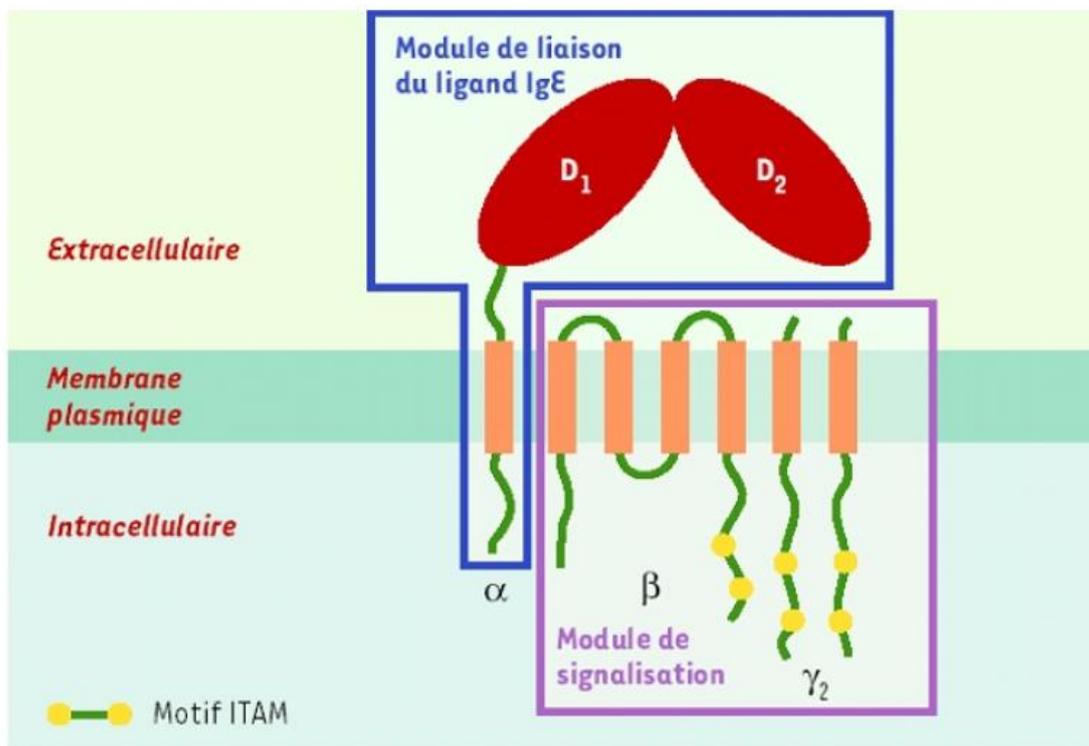


Figure № 3: Représentation schématique du FcεRI (Blank et al., 2003)

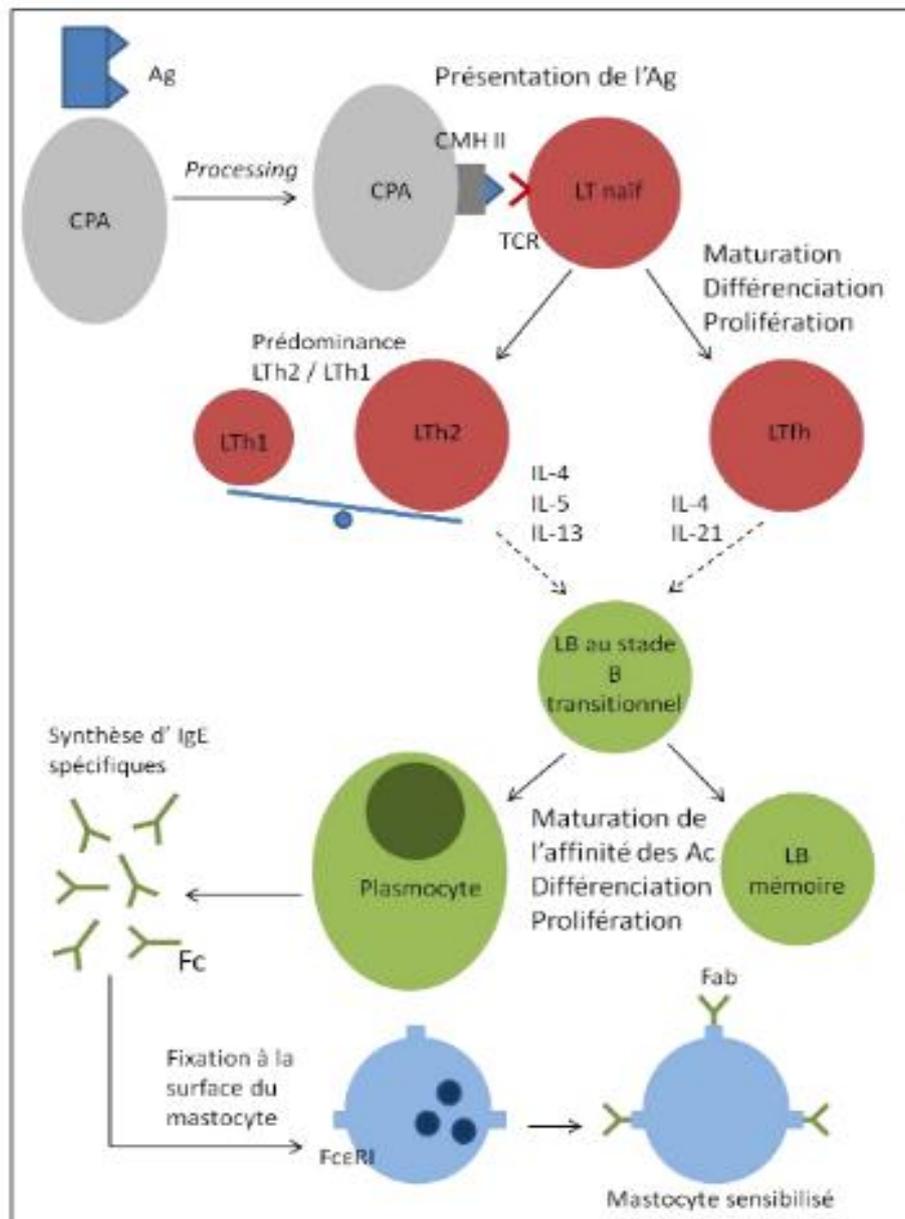


Figure N° 4: Phase de sensibilisation de l'allergie dépendante des IgE
(Chum, 2015)

Ag : antigène, **CPA** : cellule présentatrice d'antigène, **CMHII** : molécule du complexe d'histocompatibilité de type II, **LT** : lymphocyte, **TCR** : récepteur de cellule T, **IL** : interleukines, **LB** : lymphocyte B, **Ac** : anticorps, **Fc** : fragment constant, **FcεRI** : récepteur membranaire à forte affinité aux IgE, **Fab** : fragment antigen binding

La figure N° 5 fait apparaître la fixation d'antigène sur les IgE fixés sur les mastocytes (**Kumar et al., 2012**). Le pontage des IgE spécifiques entraîne l'agrégation des FcεRI et provoque la phosphorylation des résidus de tyrosines présents dans les motifs ITAM du récepteur. Il en résulte l'engagement d'autres effecteurs intracellulaires et la mise en place de multiples cascades de signalisation aboutissant finalement à la dégranulation membranaire des cellules entraînant la libération de médiateurs chimiques. La figure N° 6 résume la signalisation intracellulaire via le FcεRI aboutissant à la dégranulation des mastocytes et des basophiles (**Blank et Rivera, 2004**). Des médiateurs chimiques résultent de l'exocytose du contenu granulaire. La figure N° 7 indique la phase effectrice de l'allergie dépendante des IgE (**Chum, 2015**). Il s'agit des médiateurs préformés en particulier l'histamine, des protéases et des médiateurs néoformés (prostaglandine D2, leucotriène C4 et facteur d'activation des plaquettes) ayant comme précurseur l'acide arachidonique. Ces médiateurs attirent les granulocytes éosinophiles dans le tissu lésé et favorisent les réponses allergiques (**Mondoulet, 2005; Dubuisson et al., 2002**).

I-3- Allergènes alimentaires

Les allergènes alimentaires dits trophallergènes sont une variété d'antigènes capables de provoquer une réponse immunitaire particulière dite « allergique » liée à la synthèse d'IgE spécifiques (**Moneret-Vautrin, 1997; Manfred et Moll, 2000**). Il est distingué dans les aliments des milliers de protéines dont quelques-unes sont allergéniques (**Dubuisson et al., 2002**). Un allergène majeur est un antigène purifié contre lequel au moins 50% des patients testés présentent des IgE spécifiques. Dans le cas des tests cutanés, à concentration très faible, il donne une réponse immédiatement positive chez au moins 90% des sujets malades (**Dubuisson et al., 2002**). Un allergène est dit mineur s'il donne des réponses positives qu'avec 10 % des allergiques. L'allergène intermédiaire se situe entre ces deux types d'allergènes (**Mondoulet, 2005**). Les isoallergènes sont des molécules de même masse moléculaire et de fonctions biologiques identiques. Ils présentent une homologie d'identité des séquences d'acides aminés d'au moins 67%. Ils se différencient par leur p.I (**Dubuisson et al., 2002**). La nomenclature officiellement adoptée en 1986 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Union internationale des sociétés d'immunologie (IUIS) pour dénommer les trophallergènes est la suivante : les trois

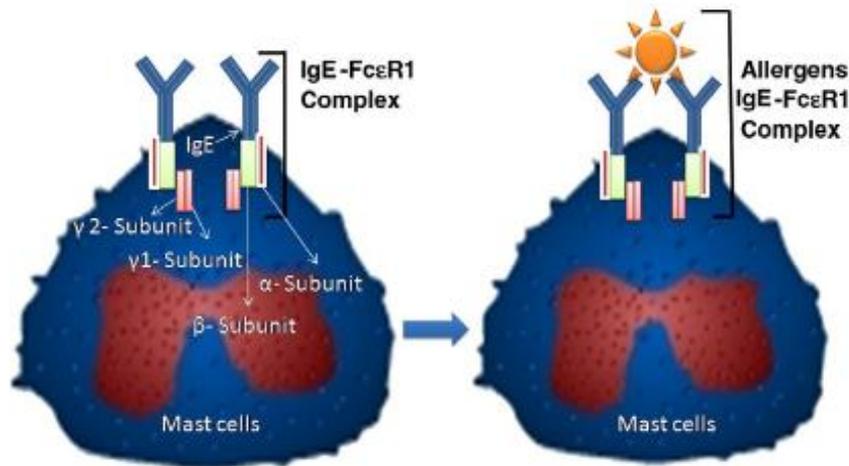


Figure № 5: Fixation d'antigène sur les IgE fixés sur les mastocytes

(Kumar et al., 2012)

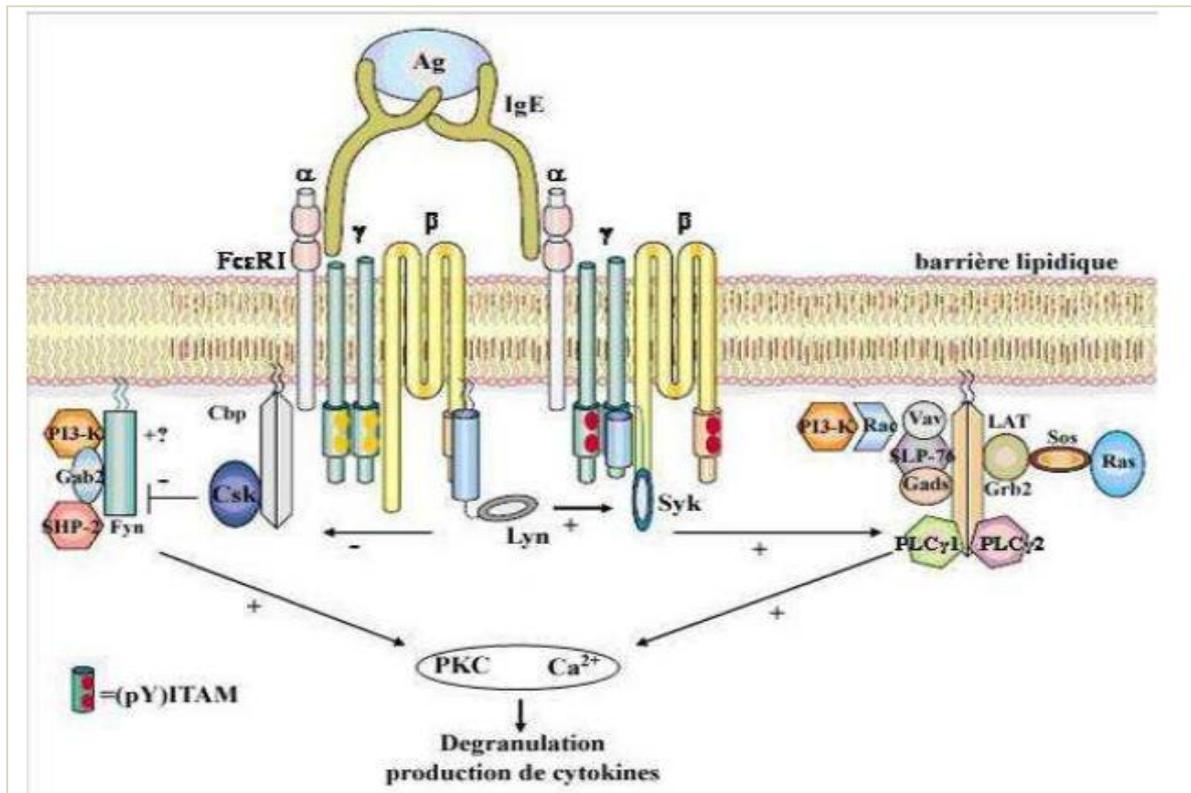


Figure № 6: Signalisation intracellulaire via le FcεRI aboutissant à la dégranulation des mastocytes et des basophiles (Blank et Rivera, 2004)

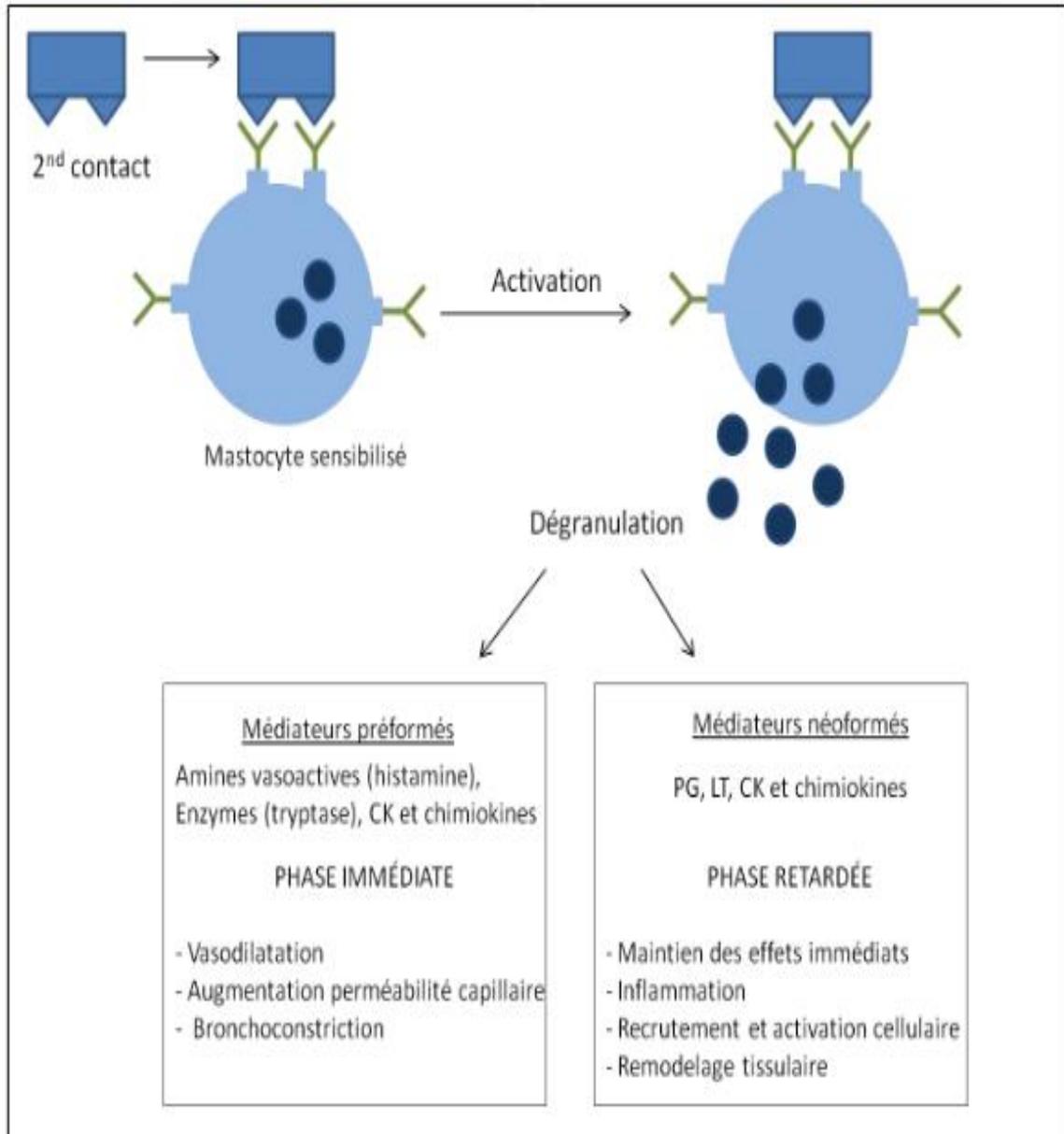


Figure N° 7: Phase effectrice de l'allergie dépendante des IgE

(Chum, 2015)

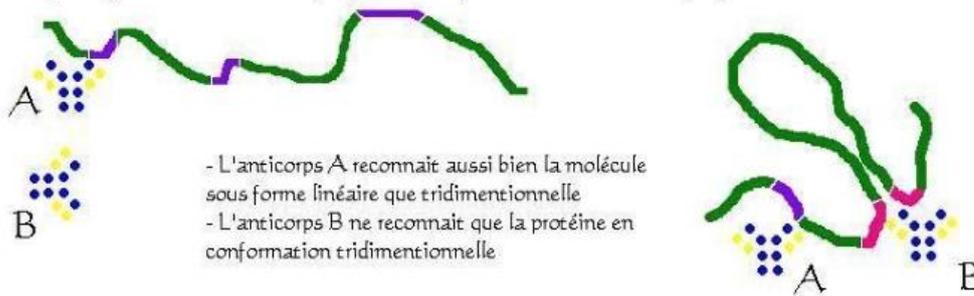
CK : cytokines, **PG** : prostaglandines, **LT** : leucotriènes

premières lettres du genre, espace, la première lettre de l'espèce, espace, un numéro (**Jacquet et Moneret-Vautrin, 2007**). Ces numéros sont choisis selon l'ordre d'identification et leurs cDNAs indépendamment de leurs propriétés physicochimiques (**Hoffman et al., 1994; Moneret-Vautrin, 1997**). Une convention adoptée par l'Union internationale des sociétés d'immunologie (IUIS) consiste à rajouter devant les noms un « n » lorsque l'allergène est d'origine naturelle et un « r » quand celui-ci est recombinant, issu d'une transgénèse (**Malandain, 2008**).

I-4- Caractéristiques générales des trophallergènes

La plupart des trophallergènes sont des glycoprotéines de pHi acides. Ils ont en moyenne une masse moléculaire relative (Mr) comprise entre 10 et 70 kDa. Ils appartiennent à la famille des albumines solubles dans l'eau ou des globulines solubles dans les solutions salines. Plus rarement, ils sont solubles dans l'alcool (**Dubuisson et al., 2002; Parent-Massin, 2005**). L'immunoréactivité est la propriété d'induire une réponse immunitaire caractérisée par la synthèse d'IgE spécifiques. Cela est dû à la présence de portions limitées dites épitopes situés généralement à la surface de la molécule dans des zones de forte flexibilité et de forte hydrophilie. Les variants antigéniques peuvent se répartir tout le long de la molécule et se localiser dans une zone particulière (**Moneret-Vautrin, 1997; Peltre, 2002; Sanchez et Frémont, 2003**). Les épitopes T réagissent avec les lymphocytes T. Ceux appelés B se lient aux IgE et réagissent avec les lymphocytes B. Les séquences des épitopes T et B sont constituées de 8 à 9 et de 8 à 16 acides aminés respectivement. Il existe des épitopes séquentiels et conformationnels (**Dubuisson et al., 2002**). La figure N° 8 représente un schéma simplifié des deux types d'épitopes (**Lifrani, 2006**). Il est à souligné l'importance des épitopes linéaires dans les phénomènes d'allergie alimentaire puisque le système immunitaire peut les rencontrer même après dénaturation partielle et digestion dans le tractus gastro-intestinal (**Mondoulet, 2005**). Les trophallergènes sont caractérisés par la stabilité à la chaleur et la résistance à la protéolyse grâce à leur structure tridimensionnelle compacte, leur ponts disulfures, leur glycolysation, leur capacité d'être liés à certains ions métalliques, des molécules lipidiques et stéroïdiques et à l'acidité modérée (**Moneret-Vautrin, 1997**). Certains possèdent des domaines répétitifs, capables de former des oligomères et une tendance à s'agréger (**Breiteneder et Mills, 2005**). Les plus fréquents chez l'enfant sont ceux

Epitopes linéaires (A) et conformationnels (B)



Réactivité croisée



Figure N° 8: Schéma des épitopes linéaires et conformationnels (Lifrani, 2006)

d'origine animale existant dans le lait, les œufs et les poissons. Les seuls trophallergènes d'origine végétale rencontrés chez le jeune enfant sont particulièrement ceux de l'arachide. Chez l'adulte, il s'agit de ceux des aliments qui croisent avec les pollens, la pomme, la pêche, la noisette, le céleri, le fenouil, le tournesol, le latex, le kiwi, l'avocat, la châtaigne, la banane, etc.... (**Manfred et Moll, 2000**). La Figure N° 9 indique la fréquence des aliments allergéniques chez l'enfant et chez l'adulte (**CICBAA, février 2005**). Selon les données, il est distingué des catégories d'aliments allergisants dont la prévalence augmente ou diminue avec l'âge. L'aliment et l'âge apparaissent comme des facteurs de risques associés au développement de la réaction allergique. L'allergénicité d'une protéine est une activité immunobiologique qui se définit par rapport à la population d'individus sensibilisés à la molécule. Ce n'est pas une propriété inhérente à ce composé et qui permettrait de le caractériser (**Lifrani, 2006**). Il existe plusieurs procédés biotechnologiques, mécaniques et thermiques permettant de réduire l'allergénicité des protéines alimentaires et fabriquer des formules hypoallergéniques (**Manfred et Moll, 2000**). L'hypoallergénicité est fondée sur l'absence ou la diminution de liaisons des IgE spécifiques avec des trophallergènes. Elle peut être le résultat de la dénaturation globale des allergènes ou de la diminution de la quantité d'allergènes majeurs d'un aliment (**Mone ret-Vautrin et Kanny, 2007**).

I-5- Procédés pour la réduction de l'allergénicité de protéines alimentaires

I-5-1- Procédés thermiques

Au cours d'une préparation alimentaire industrielle où se succèdent plusieurs opérations, une protéine dans un aliment est soumise à des contraintes pouvant altérer sa structure. Le changement de structure n'affecte a priori que les protéines globulaires. Il s'agit de molécules ayant une structure secondaire, tertiaire et quaternaire. C'est le cas des protéines du lactosérum, du blanc d'œuf, de la viande, du poisson, d'arachide, de soja, de pommes de terre, de blé et de colza (**Sanchez et Frémont, 2003**). Sous l'influence de la chaleur, il est observé une modification de plus en plus importante de la structure tridimensionnelle. A partir de 55-70°C, il y a dénaturation de la structure secondaire avec clivage des ponts disulfures à 70-80°C. La formation de nouveaux réarrangements inter et intramoléculaires est à 80-90°C. Les agrégats apparaissent entre 90-100°C (**Davis et Williams, 1998**). Au-delà de

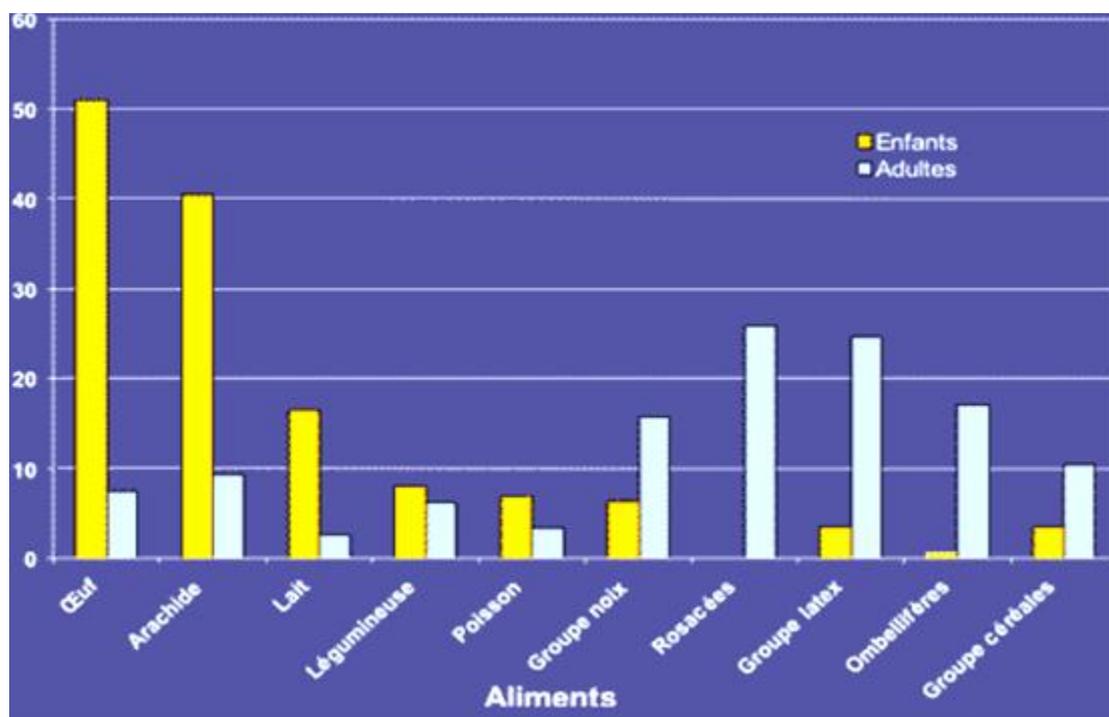


Figure № 9: Fréquence des aliments allergéniques chez l'enfant et chez l'adulte (CICBAA, février 2005)

100-125°C, il y a formation de liaisons entre les lysines et les composés glucidiques (réaction de Maillard). Les procédés thermiques incluent la cuisson en chaleur sèche (cuisson au four, friture, cuisson à infrarouge...) et humide (cuisson traditionnelle dans l'eau avec blanchiment ou ébullition prolongée, à la vapeur, au four à microondes ou autoclave et extrusion). En général, une augmentation de la température et du temps de chauffage conduit à la réduction de l'allergénicité des protéines. Il est constaté que certains modes de cuisson l'accroissent. Au four à micro-ondes, le chauffage de la farine de lupin pendant 30 min, n'induit que des altérations mineures de l'allergénicité. Il en est de même après extrusion ou ébullition. Seul un traitement à l'autoclave à 138°C et 2,56 atm pendant au moins 30 min affecte l'allergénicité (**Alvarez- Alvarez et al., 2005**). Au micro-ondes, la réactivité des gliadines du blé augmente lorsque l'énergie délivrée avoisine 30-40 kJ. Au-delà, il est observé une diminution progressive de l'immunoréactivité.

I-5-2- Procédés enzymatiques

L'hydrolyse enzymatique est capable de dégrader un épitope séquentiel ou conformationnel. L'enzyme utilisée rompt la molécule au niveau du site de fixation. C'est le cas des actions de la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. Des modèles de digestions avec ces catalyseurs biologiques sont mis au point pour évaluer l'aptitude d'un allergène à être dénaturé. La résistance au processus de digestion est un puissant facteur d'allergénicité (**Astwood et al., 1996**). Sur la base de ce principe, toute évaluation du risque d'allergénicité d'un organisme génétiquement modifié (O.G.M) passe obligatoirement par l'évaluation des effets de la digestion sur les structures de la protéine (**ALINORM 03/34: FAO/WHO Food Standard Programme, 2003**).

I-6- Facteurs non thermiques modifiant l'allergénicité des protéines : germination, pH, irradiation aux rayons γ et fermentation

Certains procédés non-thermiques peuvent modifier l'allergénicité des protéines. La germination n'est pas connue pour modifier l'allergénicité des protéines ou de produire des néo-allergènes. Néanmoins, un cas isolé d'anaphylaxie aux pousses d'orge a été récemment déclaré au réseau d'Allergovigilance en octobre 2007 (**Moneret-Vautrin, 2008**). Des pH extrêmes peuvent modifier les protéines et induire l'apparition de néo-allergènes comme les produits d'hydrolyse du gluten et les isolats

de protéines de blé (**Lachance, 1988 ; Leduc, 2003**). La réduction de l'allergénicité est proportionnelle à la dose d'irradiation γ (**Byun et al., 2000**). Des résultats sont obtenus avec la crevette, l' α -caséine et la β -lactoglobuline du lait et l'ovomucoïde de l'œuf de poule. Parallèlement, Il y a formation d'agrégats protéiques due à la diminution de la solubilité des protéines du lait de vache (**Lee et al., 2001 ; Lee et al., 2002**). La fermentation contribue à la réduction de l'allergénicité des protéines alimentaires. Il est montré que les allergènes de soja sont totalement hydrolysés au cours du procédé de fabrication de sauces de soja (**Kobayashi et al., 2004**). Le principe d'hydrolyse des allergènes par les ferments traditionnels japonais et en particulier du riz inoculé avec *Aspergillus oryzae* utilisé pour la fabrication du miso - 23 - saké ou de la sauce de soja est repris pour modifier l'allergénicité de l'arachide (**Moneret-Vautrin, 2008**). **Pan et al.**, ont comparé l'efficacité d'un mélange composé d'*Aspergillus oryzae* et de bactéries lactiques *Pediococcus parvulus* et celui formé d'*Enterococcus faecium* avec *Lactobacillus rhamnosus* LGG sur un modèle murin d'allergie à l'arachide. Ils ont révélé l'absolue inefficacité de LGG. Par contre, le premier mélange réduit significativement en fonction des concentrations variant de 30 à 50 % le nombre de souris présentant une anaphylaxie à l'arachide après le test de provocation (**Pan et al., 2006**).

I-7- Légumineuses sources d'allergénicité consommées dans l'alimentation humaine

Certains individus sont allergiques à certaines légumineuses comme le soja, le sésame, la lentille, le pois vert, l'arachide etc... Le soja est une légumineuse annuelle originaire de Chine dont les protéines sont largement utilisées dans le monde pour leur qualité nutritionnelle (**Cucu et al., 2012**). Leur taux dans la graine varie entre 30 et 50 %. Elles représentent 90 % de globulines et 10 % d'albumines (**Patricia, 2008**). Parmi les 21 protéines allergéniques détectées se trouve la glycinine reconnue comme allergène majeur de masse moléculaire allant de 300 à 380 kDa (**Wilson et al., 2005 ; Mujoo et al., 2003**). Le sésame, *Sesamum indicum* L ou *Sesamum orientale* L, appartient à famille des Pedaliaceae (**Agne et al., 2003**). Sa teneur en protéines est de 22 à 25 %. Les taux d'albumines, de globulines, de prolamines et de glutélines sont successivement 8,9 %, 67,3 %, 1,3 % et 6,9 % (**Rivas et al., 1981**). L'allergène majeur est l'albumine 2S de $M_r \approx 9$ kDa (**Pastorello et al., 2001**). Plus récemment, 10

protéines reconnues par les IgE sont identifiées (**Beyer et al., 2002 ; Wolff et al., 2003**). La lentille *Lens culinaris* est une légumineuse herbacée annuelle appartenant à la famille des Papilionaceae. C'est une espèce méditerranéenne. Elle a une teneur en protéines de 21 à 31 % (**Urbano et al., 2007; Joshi et al., 2011**). Les protéines de réserve de lentilles sont principalement des globulines (**Osborne et al., 1898 ; Joshi et al., 2011 ; Joshi et al., 2012**). Parmi les protéines allergènes il existe Len c 1.01 appelé viciline qui est un allergène majeur. Ce dernier est une glycoprotéine de masse moléculaire de 48 kDa. Le pois vert (*Pisum sativum*) appartient à la famille des Papilionaceae. La graine de pois, à l'état sec contient 20 à 25 % de protéines Les protéines allergènes potentielles sont l'albumine et les deux globulines de type 7S la viciline et la conviciline (**Sanchez-Monge et al., 2000 ; Malley et al., 2004 ; Sell et al., 2005**). L'arachide *Arachis hypogaea* est une légumineuse annuelle de la famille des papilionaceae. Elle est originaire de Brésil. L'Inde en est le principal producteur de cette denrée (**Mondoulet, 2005**). La cacahuète, est composée en moyenne de 23 à 27 % de protéines (**Souci, 1994**). L'arachide est consommée sous forme de cacahuètes fraîches ou grillées, d'huile et de beurre. Elle est présente dans de nombreux aliments, notamment industriels. Elle peut également être pressée, désaromatisée puis aromatisée de façon à ressembler à l'amande, les pacanes, etc... (**Dubuisson et al., 2002**). Les protéines de cette denrée peuvent constituer des allergènes masqués.

I-8- Allergie à l'arachide

L'allergie à l'arachide est un véritable problème de santé publique dans certains pays en raison de sa fréquence, de la sévérité des manifestations cliniques et de sa persistance (**Lifrani, 2006**). L'arachide est une source allergénique majeure. La prévalence de l'allergie à l'arachide a fortement augmenté ces dernières années dans différents pays (**Grundy et al., 2002 ; Sicherer et al., 2003**). L'allergie à cette denrée apparaît généralement pendant l'enfance, avant l'âge d'un an dans 46 % des cas et avant 15 ans dans 93 % des cas (**Moneret-Vautrin et al., 1998**). Cet aliment est responsable de 23 % des urgences allergiques pédiatriques. Une des difficultés de la pathologie est de respecter une stricte éviction de ce produit. La quantité de protéines provoquant la réaction allergique est très faible par rapport aux autres aliments (**Moneret-Vautrin et al., 1998; Flinterman et al., 2006**). **Peeters et al., 2007**, ont déterminé que la dose-seuil au-dessous de laquelle aucun symptôme n'est observé

dans une population d'allergiques est 10 µg. Des personnes allergiques à l'arachide le sont aussi aux amandes (50 %), cajous (40 %), pistaches (30 %), noix du Brésil (26 %) et noisettes (21 %). D'autres réactions croisées peuvent avoir lieu avec des légumineuses comme les lentilles, le soja et l'haricot (**Bernhisel-Broadbent et Sampson, 1989**). Les essais de désensibilisation provoqués par des injections d'extraits d'arachide menés chez certains patients allergiques ont permis d'augmenter le seuil de tolérance chez certains cas mais le résultat est très discuté (**Oppenheimer et al., 1992**).

I-9- Allergènes de l'arachide

Les protéines d'arachide sont subdivisées en arachine et conarachine. Ces dernières sont des globulines qui s'associent réversiblement en solution. Elles représentent plus de 75 % des protéines de la graine. L'arachine est décrite par Yotsuhashi et Shibasaki, 1976 comme une entité de Mr=180 kDa sous forme monomérique et de p.I de 5,1. Elle existe sous 2 formes polymorphiques A et B qui se dissocient en sous-unités de Mr allant de 20 à 71 kDa (**Tombs, 1965**). La conarachine est une entité protéique de Mr=295 kDa de p.I \approx 3,9. Elle est constituée de 7 sous-unités (**Mondoulet, 2005**). Il y a les globulines 7S et 11S (viciline et glycinine) et les albumines 2S (conglutine) (**Blanc, 2008**). Outre ces protéines quantitativement majeures, elle comprend plus de 30 protéines différentes. Plus de 10 d'entre elles sont capables de fixer les IgE d'individus sensibilisés (**Kleber-Janke et al., 1999**). De nombreuses protéines sont caractérisées et identifiées comme allergènes. L'IUIS (International Union of Immunological Societies) répertorie 13 allergènes nommés de « Ara h 1 » à « Ara h 13 » rapportées dans le tableau N° 2. D'après la nomenclature « Ara » pour Arachis, « h » pour hypogaea et le nombre indique l'ordre de découverte. Les structures de l'Ara h1, l'Ara h2, l'Ara h3, l'Ara h5, l'Ara h6, l'Ara h8 et l'Ara h9 sont représentées dans les figures N° 10, N° 11, N° 12, N° 13, N° 14, N° 15 et N° 16 respectivement. **Bouakkadia et al., 2015** ont déterminé les caractéristiques des protéines allergènes non-hydrosolubles de l'arachide obtenues par extraction en détergent et agents chaotropiques. La technique de l'immunoprotéomique a permis d'identifier non seulement les allergènes majeurs de pertinence clinique mais aussi 10 protéines jamais décrites en tant qu'allergènes dans cette légumineuse. Trois d'entre elles ont des homologues allergéniques dans d'autres organismes correspondant à des

Tableau N° 2: Protéines allergènes de l'arachide répertoriées par International Union of Immunological Societies (IUIS) (Bouakkadia H et al., 2015)

Nom	Famille de protéines	Mr (kDa)	pI
Ara h1	Cupine (Viciline-type, 7S globuline)	64	6,4
Ara h2	2S albumine (conglutine)	17	5,9
Ara h3	11S globuline (trypsine inhibiteur, glycinine)	60,4	5,4
Ara h4	Renommé Ara h3, 02		
Ara h5	Profiline	14,1	4,7
Ara h6	2S albumine (conglutine)	16,8	6,1
Ara h7	2S protéine 2	18,5	6,8
Ara h8	Pathogenesis-related protéin PR-10 (membre de la famille Bet v1)	16,9	5,1
Ara h9	Protéine non spécifique de transfert de lipide	11,6	9,5
Ara h10	16 kDa oléosine 1	17,7	9,6
Ara h11	14 kDa oléosine 2	14,3	10,1
Ara h12	Défensine	8 kDa (reduit) ou 12 kDa (non réduit)	ND
Ara h13	Défensine	8 kDa (reduit) ou 11 kDa (non réduit)	ND
Agglutine	Lectine fixant le galactose	29,3	5,4
Ara h oléosine 18 kDa	Oléosine	18,4	5,4

- **Mr** : Masse moléculaire relative
- **pI** : point Isoélectrique

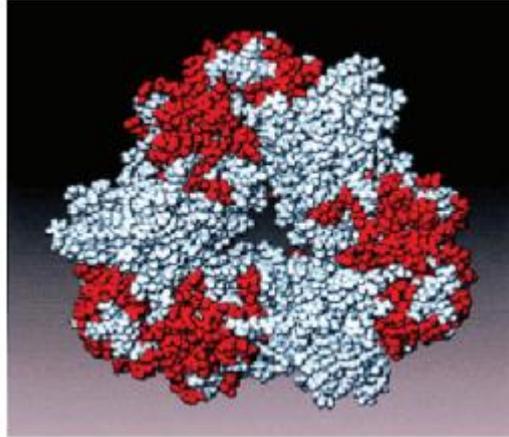


Figure N° 10 : Modèle moléculaire du trimère de l'Ara h1 (de Leon et al., 2007)

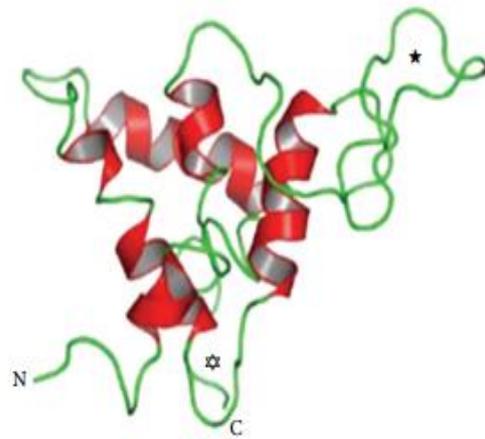


Figure N° 11: Modèle en ruban de l'Ara h2 (Zhou et al., 2013)

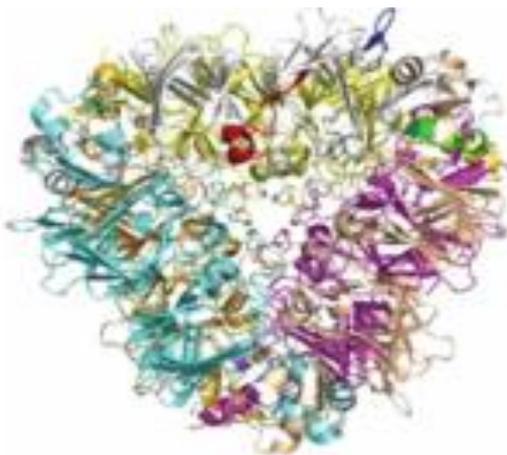


Figure N° 12: Modèle moléculaire de l'Ara h3 (Zhou et al., 2013)

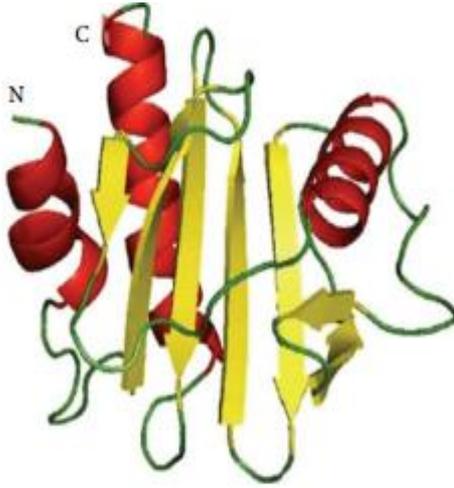


Figure N° 14: Modèle en ribbon de l'Ara h5
(Zhou et al., 2013)

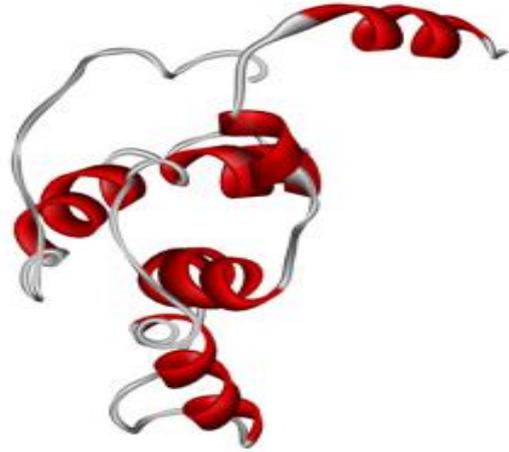


Figure N° 13: Modèle en ribbon de l'Ara h6
(Somkuti et Smeller., 2013)



Figure N° 15: Modèle en ribbon de l'Ara h8
(Rougé et al., 2009)



Figure N° 16: Modèle en ribbon de l'Ara h9
(Rougé et al., 2009)

protéines ressemblant à Fus c 3, Asp f PUP ou Dio p TSP et Asp f IPMI. Ces molécules sont données dans le tableau N° 3. L'allergénicité de cet aliment sous sa forme grillée est supérieure à celle sous la forme crue ou bouillie. La consommation de l'arachide grillée aux USA et en Europe et son utilisation essentiellement bouillie en Chine explique la différence de prévalence de l'allergie (**Beyer et al., 2001**). Le rôtiage des cacahuètes contribue à augmenter l'affinité des IgE vis-à-vis des épitopes. L'Ara h2 est un homologue de l'inhibiteur de la trypsine. L'activité fonctionnelle de l'Ara h2 après rôtiage est 3 à 6 fois plus importante (**Maleki et al., 2003**).

I-10- Identification des isoallergènes

L'analyse protéomique permet d'identifier l'ensemble des protéines d'un organisme ou d'un organe. Les figures N° 17 et N° 18, montrent successivement le processus de la digestion trypsique des protéines allergènes et les étapes d'identification des trophallergènes. L'électrophorèse bidimensionnelle permet la séparation et la révélation des substances protéiques. Les immunoempreintes font apparaître les molécules allergisantes. Il est décelé les molécules dites isoallergènes de même masses moléculaires mais de p.I différents en raison des différences mineures dans les séquences d'acides aminés (**Matthias, 2001**). Des informations sur la séquence en acides aminés des peptides peuvent être obtenues grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse tandem (MS/MS). Le premier spectromètre est utilisé pour séparer en fonction du rapport M/2 les oligopeptides d'un hydrolysate de protéines. L'oligopeptide ionisé et sélectionné est dirigé vers un second spectromètre pour la fragmentation par collision avec des molécules d'hélium ou d'argon. Un grand nombre de séquences en acides aminés de protéines allergènes sont actuellement disponibles dans des banques de données Genbank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), Uni-Prot et PDB (Protein Data Bank). Ces banques fournissent des réponses sur la fonction, les modifications post-traductionnelles, les domaines et les sites catalytiques (**Brusic et al., 2003**).

Tableau № 3: Protéines non-hydrosolubles de l'arachide identifiées comme allergènes nouveaux (Bouakkadia et al., 2015)

Numéros d'accessions	Nom de protéines	Fonctions	Parentés allergéniques		
			Allergènes	Sources	Règnes
	Fixation de nucléotide/ADN/ARN				
Q9LYJ9 Q9S9K9 Q8L770	DEAD- box ATP- dependent RNA helicase 46 Facteur de transcription MYB3 Clp Protéase ATP- dépendante	hydrolase, hélicase régulation de la transcription endopeptidase	(inconnu) Fus c 3 (inconnu)	Fusarium culmorum	champignon
Q9CAF5 F6HDM2 A1EA40 Q9LL85	Transporteur ABC famille I (membre 6) ATP- dependent (S)- NAD(P)H- hydrate dehydratase DNA- directed RNA polymerase Protéine liant l'ADN simple brin WHYI	lyase transférase/polymérase activateur de transcription de PR10	Dio p TSP Asp f IPMI (inconnu) (inconnu)	Dioscorea polystachya Aspergillus fumigatus	plante (igname) champignon
	Transport				
Q9SJE8 A2Y LX7	Aluminium- activated malate transporter 2 Protéine LHCP de translocation	Transporteur de malate et d'ions Transport de protéines de la photosynthèse	(inconnu) (inconnu)		
	Métabolisme/ catabolisme				
Q8LF48	3- ketoacyl- CoA thiolase 1, perxisomal	potentiel redox, transférase	(inconnu)		

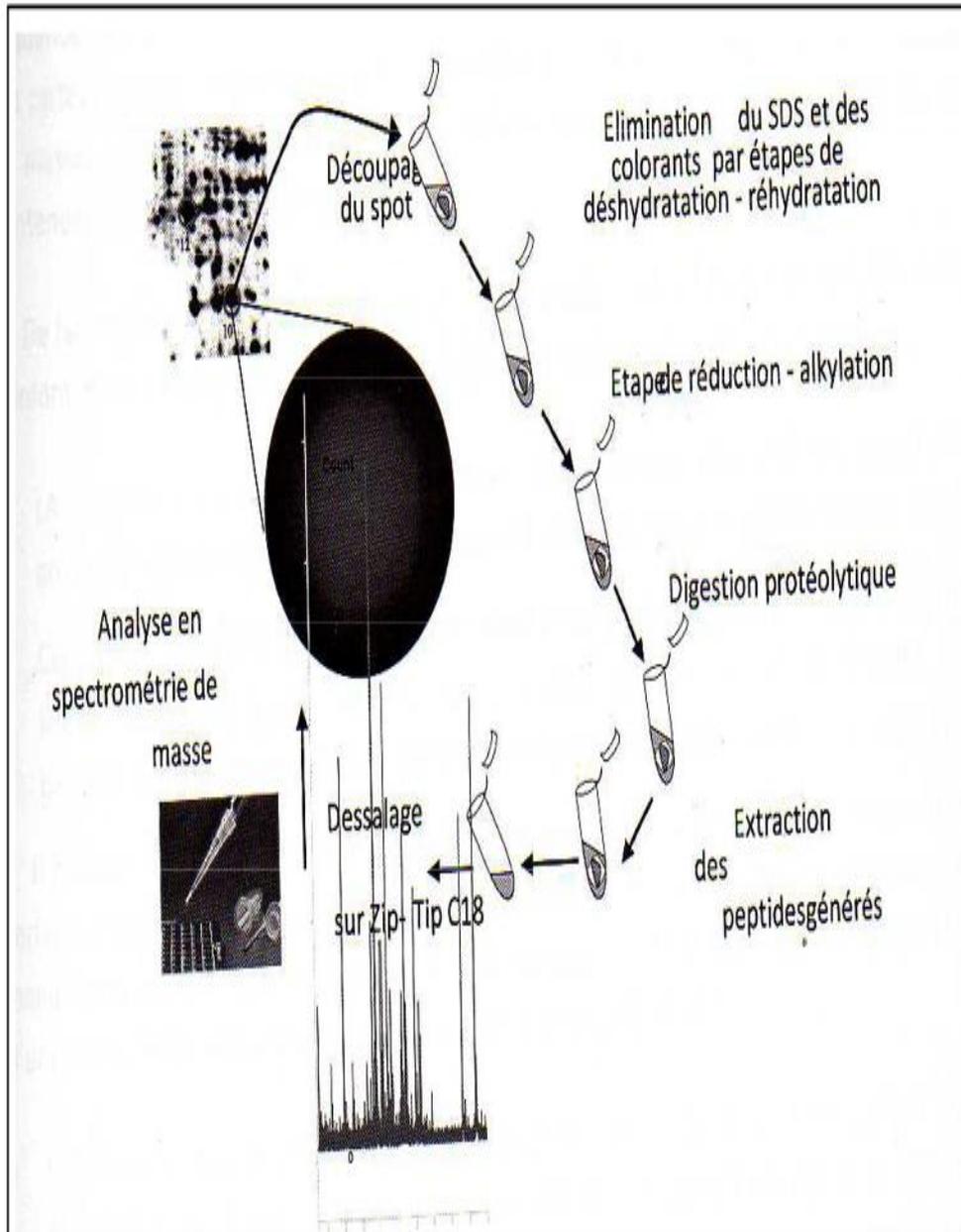


Figure N° 17: Processus de la digestion trypsique des trophallergènes

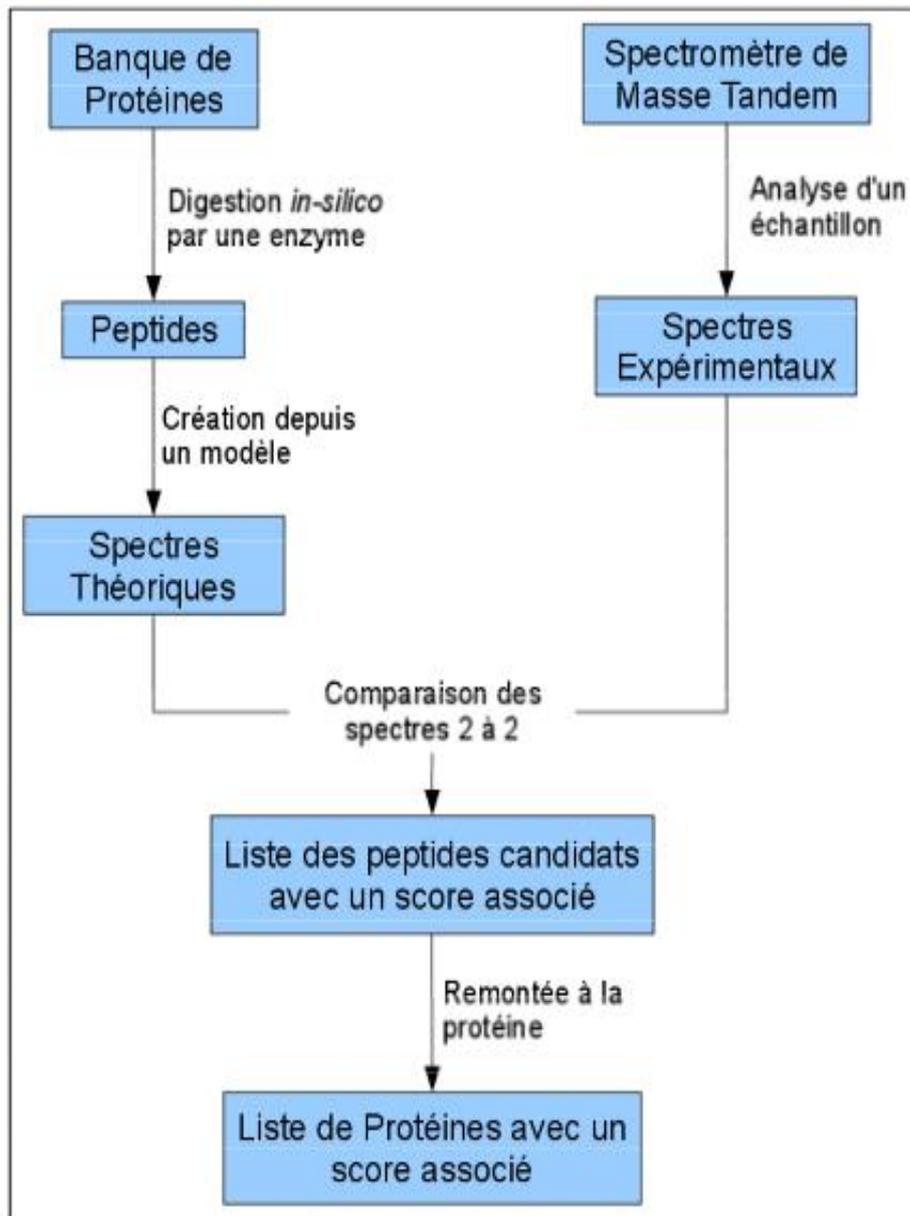


Figure N° 18: Etapes d'identification des trophallergènes

Matériel et méthodes d'analyses

II-Matériel et méthodes d'analyses

II-1- Matériel biologique

L'arachide est menée en culture biologique dans la région d'El-Kala -Algérie. Le semis a lieu en Avril-Mai et la récolte est faite manuellement en Juillet-Aout. Les graines sont conservées à température ambiante jusqu'à leur utilisation. Le sérum d'une enfant âgée de 7 ans allergique à l'arachide est fourni par le laboratoire d'Immunologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) d'Amiens pour l'étude de la sensibilité aux protéines hydrosolubles de cette denrée. Les IgE anti-trophallergènes de l'arachide, l'Ara h1, l'Ara h2 et l'Ara h3 déterminées par méthode immuno-enzymatique (PHADIA) sont 68.10 ku/l, 20.50 ku/l, 31.20 ku/l et 1.18 ku/l respectivement.

II-2- Méthodes d'analyses

II-2-1- Délipidation de la farine d'arachide et préparation de l'échantillon

A l'aide d'un broyeur (Analytical Mill 11 A, Ika, USA), les graines d'arachide sont broyées. La délipidation du produit obtenu se fait à chaud dans un extracteur type soxhlet (système de reflux) pendant 8 heures (Penchev, 2010). 50 g de farine sont placés dans la cartouche et traités avec 500 ml d'hexane (Biochem Chemopharma (Montreal, Quebec). Lorsque l'hexane contenu dans le ballon arrive à ébullition, les vapeurs passent par le tube de distillation et pénètrent dans le réfrigérant où elles sont liquéfiées. Le condensat retombe sur la cartouche et s'accumule jusqu'au sommet du tube-siphon puis retourne dans le ballon contenant le solvant organique. A la fin du procédé, le produit délipidé est séché à l'air libre pendant 48 heures puis moulu.

II-2-2- Détermination du taux de protéines totales de la farine délipidée de l'arachide

Le taux de protéines totales de la farine délipidée de l'arachide est déterminé par la méthode de Kjeldhal (A.O.A.C., **Official Methods of Analysis, 1984**). 01 g de farine sont introduits dans le ballon de l'appareil pour la minéralisation. Il est ajouté 10 g sulfate de potassium, une quantité appropriée du catalyseur composé de 0,9 g de sulfate de cuivre, 25 ml d'acide sulfurique concentré et quelques granules de pierre ponce. L'ensemble est homogénéisé et chauffé jusqu'à ébullition. L'opération est

arrêtée une heure après l'apparition de la solution limpide. Après refroidissement, 250 ml d'eau distillée sont ajoutés avec précaution en agitant pour dissoudre complètement les sulfates. Il est ensuite placé 25 ml H₂SO₄ 0,1N et quelques gouttes de rouge de méthyle dans le flacon collecteur. Ce dernier est lié au réfrigérant du distillateur. Il est versé lentement 100 ml de NaOH 40 % et 25 ml de la solution de thiosulfate de sodium dans le ballon. Il est récupéré 150 ml de liquide après 30 min de distillation. L'excès d'acide sulfurique est titré par NaOH 0,1N jusqu'au virage de la couleur au jaune clair. Le taux de protéines totales est calculé par la relation suivante :

$$\text{Teneur en protéine (\%)} = \frac{A \times B \times M_N \times 100 \times f}{m}$$

Où :

A = Volume H₂SO₄ 0,1N nécessaire à la titration de NaOH (ml)

B = Normalité de NaOH (0,1N)

m = Masse de l'échantillon minéralisé (g)

M_N = Masse molaire de l'azote 14 g mol⁻¹

f = Facteur de conversion (6,25)

II-2-3- Extraction des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide

2 g de farine sont mis en suspension dans 15ml d'eau distillée. Après 20 heures d'agitation sur roue à température ambiante et centrifugation (centrifugeuse réfrigérée, Sigma 2-6K, Fisher Bioblock Scientific, Germany) à 18000 g à 4°C pendant 20 min, le surnageant séparé est conservé à -20°C. Le culot est soumis à 4 extractions successives pendant 2 heures. La densité optique (D.O) de chaque extrait est mesurée à λ = 280 nm en utilisant un spectrophotomètre (UV-Visible, UviLine 9400 Secomam, France) afin de constater l'extraction de la totalité des protéines (Bouakkadia et al., 2015). Cette méthode sert pour l'extraction des protéines hydrosolubles de la farine d'arachide grillée à 140°C pendant 40 min pour étudier leur résistance au traitement thermique appliqué. La figure N° 19 montre le diagramme d'isolement de ce type de macromolécules de la légumineuse considérée.

Matériel et méthodes d'analyses

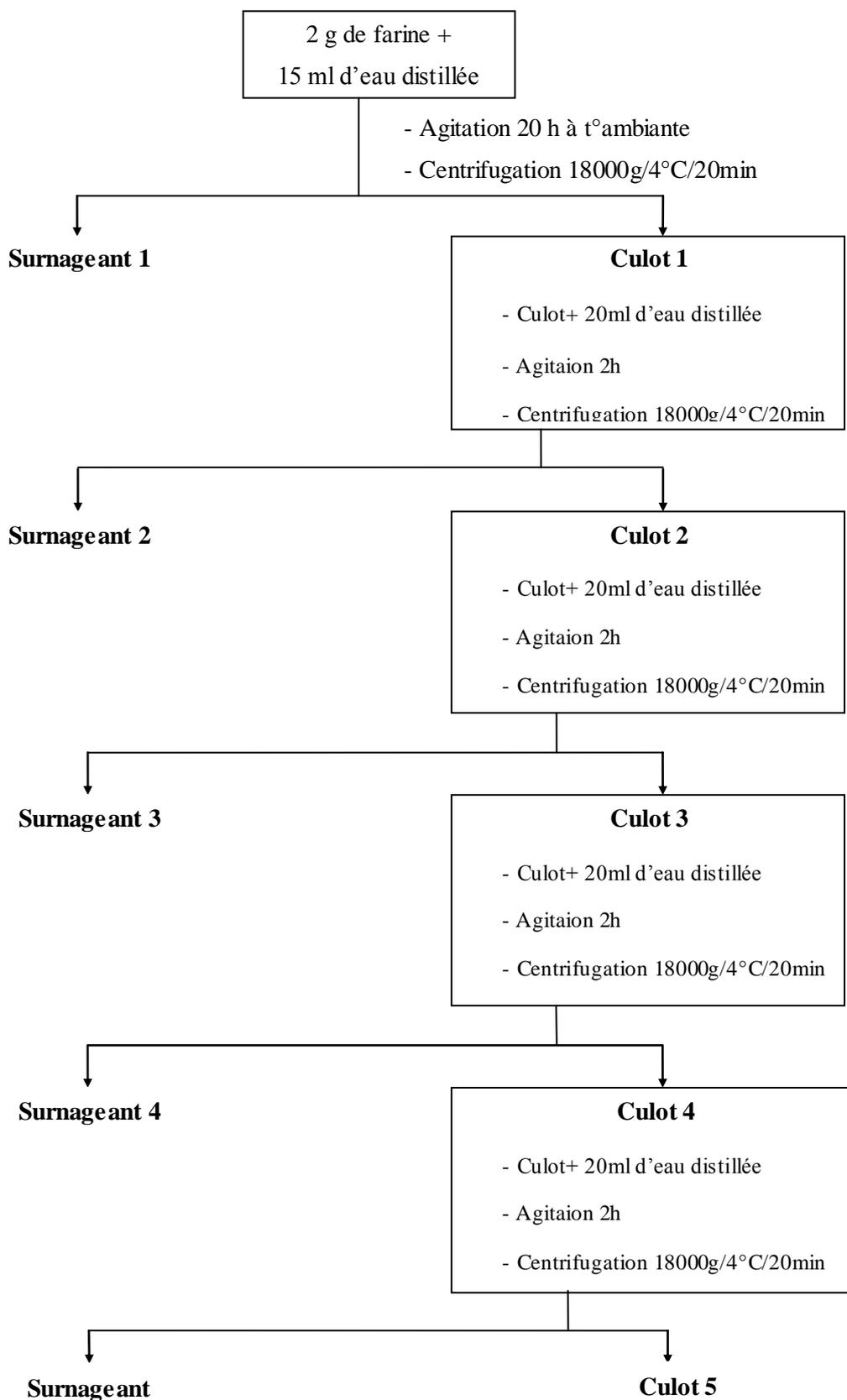


Figure N° 19: Diagramme d'extraction des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide (Bouakkadia et al., 2015)

II-2-4- Détermination du taux de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide

Le taux de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide est déterminé par la méthode de Bradford, 1976. Le bleu de Coomassie G-250 forme avec les protéines un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à $\lambda = 595\text{nm}$. La coloration très sensible reste stable pendant 30 min. Le sérum d'albumine bovine (S.A.B) est utilisé comme témoin. Pour préparer le réactif de Bradford, 100 mg de bleu de Coomassie G-250 sont ajoutés à 50 ml d'éthanol 95 %. Après agitation magnétique pendant 2 heures, 100 ml d'acide orthophosphorique 85 % sont ajoutés et le volume est ajusté avec de l'eau distillée à 1 litre. La solution obtenue est filtrée et conservée à l'abri de la lumière. Pour ce qui est de la mesure, 50 μl d'échantillon sont additionnés à 2 ml de la solution de Bradford. Le mélange est agité et laissé pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur. L'absorbance est mesurée à $\lambda = 595\text{nm}$. La gamme d'étalonnage réalisée avec le sérum d'albumine bovine (S.A.B) est donnée dans le tableau N° 4. De la courbe d'étalonnage représentée dans la figure N° 20, il est déterminé la concentration en protéines exprimée en mg/ml puis le taux de protéines hydrosolubles.

II-2-5- Détermination du taux de protéines non hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide

Le taux de protéines non hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide est déterminé par la méthode de kjeldhal décrite précédemment.

II-2-6- Séparation des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue par électrophorèse bidimensionnelle (2D) sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)

L'équivalent de 200 μg de protéines obtenu après lyophilisation est solubilisé dans 125 μl d'une solution de réhydratation composée d'urée 7M, CHAPS 4 %, thiourée 2M et Bio-Lyte 0,6 %. Un dépôt est effectué sur des strips de 7 cm de longueur. Le gradient linéaire de pH est de 3 à 7 (Biorad). L'appareil est PROTEAN il2 IEF (Biorad). L'isoélectrofocalisation est à 250 V et 50 μA pendant 20 min puis 4000 V et 50 μA durant 4 h à 20°C. Pour le fractionnement en fonction des Mr des

Tableau N° 4: Gamme d'étalonnage réalisée avec le Sérum d'Albumine Bovine (S.A.B)

N° de tube	1	2	3	4	5	6
Solution de S.A.B (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif de Bradford (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

S.A.B : Sérum Albumine Bovine

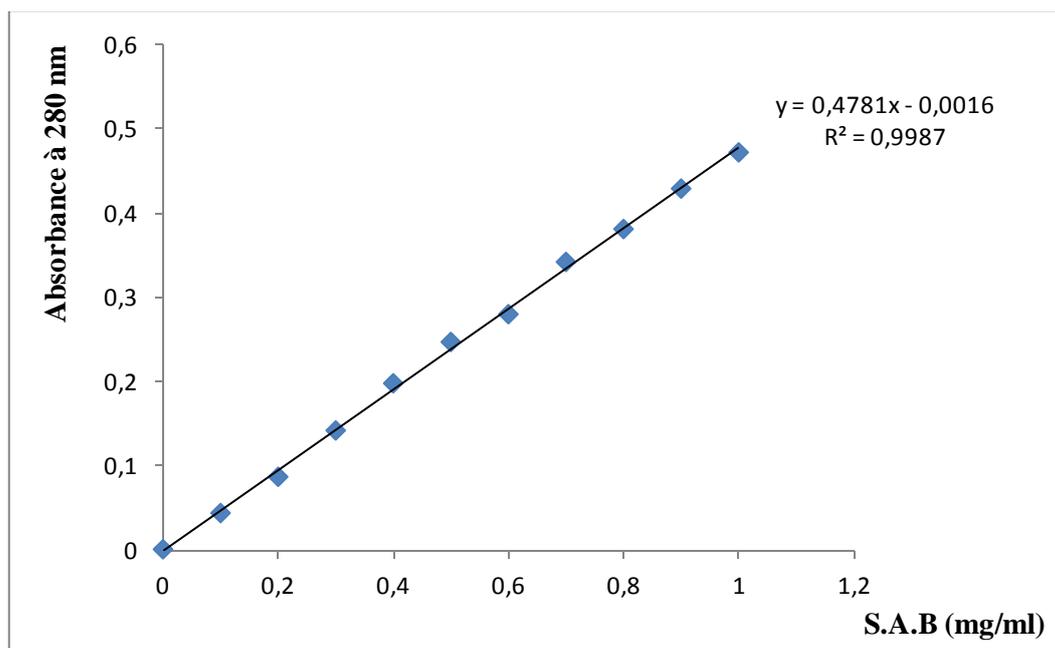


Figure N° 20: Courbe d'étalonnage pour la mesure de la concentration en protéines hydrosolubles

S.A.B : Sérum Albumine Bovine

macromolécules recherchées, le support ayant servi pour la première dimension est équilibré dans 25 ml du tampon constitué d'urée 6M, SDS 2 %, Tris-HCl 0,375M (pH 8,8), glycérol 20 %, DTT 2 % deux fois pour 10 min dans les conditions du laboratoire puis placé sur le gel TGX-12 (Biorad). Les Mr des protéines témoins sont de 10 à 250 kDa (cission Plus Protein™ Prestained Standards 10–250 kDa, Biorad). Le mini-système PROTEAN Tetracell (Biorad, Hercules, CA) est utilisé. Après 45 min de migration à 200 V et 120 uA, Le gel est coloré avec une composition de bleu de Coomassie R-250 (Bio-Safe Coomassie, Biorad) durant 1 h et décoloré avec de l'eau distillée puis photographié avec un système de formation d'image.

II-2-7- Séparation des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue par électrophorèse monodimensionnelle (1D) sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)

15 µl de l'extrait protéique et 15 µl du tampon formé de Tris 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0.1 % (pH=8.3, Biorad) chauffés 5 min à 105°C et refroidis à température ambiante sont introduits dans les puits du mini gel TGX (12 %) (Biorad). Les marqueurs de tailles employés couvrent une gamme de Mr variant de 10 à 250 kDa. Le mini-système PROTEAN TetraCell (Biorad, Hercules, CA) est employé. L'électrophorèse est concrétisée à 200 V et 120 uA en 45 min. La révélation des bandes électrophorétiques est obtenue par coloration au bleu de Coomassie R-250 et décoloration à l'eau distillée du gel. Ce dernier est photographié avec un système de formation d'image.

II-2-8- Extraction et séparation des protéines hydrosolubles de l'arachide grillée à 140°C pendant 40 minutes par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)

L'extraction et la séparation des substances protéiques de l'arachide grillée à 140°C pendant 40 min par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes sont accomplies selon les protocoles expérimentaux décrits pour la denrée non soumise au traitement thermique.

II-2-9- Immunoempreintes des composés protéiques hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Les composés protéiques séparés par électrophorèse monodimensionnelle sont transférés en milieu semi-sec à l'aide de l'appareil Trans-blot Turbo (Biorad). Sur la cathode est posé un ensemble fait de 3 feuilles de papier Wathman, le gel, la membrane de nitrocellulose et 3 feuilles de papier Wathman. Le tout est imbibé dans le tampon de transfert conçu de tris 25 mM et glycine 192 mM de pH= 8,3. L'opération se déroule à une tension de 25 V et une intensité de 1,3 uA durant 10 min. La membrane de nitrocellulose est laissée dans le tampon de saturation TBS-T préparé avec du Tris-HCl 20 mM de pH=7,6 et Tween-20 0,1 % (V/V) contenant 5 % (P/V) de lait écrémé (en eau distillée) une nuit à 4°C. Après trois lavages successifs de 5 min avec ce même produit puis une nuit d'incubation à 4°C avec le sérum dilué de la patiente et trois autres accomplis dans les mêmes conditions avant le maintien 1h à température ambiante avec un anticorps conjugué anti-IgA couplé à la peroxydase dilué au 1/20000^{ème}, trois derniers rinçages de 5 min chacun sont réalisés afin d'incuber durant 5 min avec 10 ml d'Amersham ECL Prime (GE Healthcare) constitué avec un mélange 1/1 des préparations de luminol et de peroxyde.

II-2-10-Identification des protéines séparées par électrophorèse bi et monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate et des composés protéiques immunoréactifs de la farine délipidée d'arachide

II-2-10-1- Digestion tryptique des protéines

Les entités moléculaires sont excisées manuellement du gel. Elles sont mises avec 1 ml d'eau distillée dans des tubes Eppendorf. Après 5 min d'agitation à 700 t/min pour enlever toute matière indésirable, puis nettoyage de 10 min à l'acétonitrile 100%, elles sont réduites par le dithiothréitol (10 mM dans NH₄HCO₃ 50 mM), alkylées par l'iodoacétamide (50 mM dans NH₄HCO₃ 50 mM) et digérées par la trypsine 0,1 µg/µl. La solution enzymatique formée de NH₄HCO₃ 25 mM, CaCl₂ 5 mM et trypsine 12,5 mg/ml est placée à 4°C pour éviter toute autolyse prématurée de l'enzyme. Après élimination de l'excès de liquide et addition d'un volume de NH₄HCO₃ 25 mM de manière à submerger les portions du gel, le milieu est porté à 37°C pour 2 heures sous agitation à 700 t/min (Shevchenko et al., 2007).

II-2-10-2- Identification des protéines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Pour l'identification des protéines par analyse LC-MS/MS, le système UltiMate 3000 RSLC (ThermoFisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific) est exploité. La chromatographie est opérée dans une colonne capillaire en phase inverse (Acclaim Pepmap C18 3 µm 100A, id 75 µm 15cm de longueur, ThermoFisher Scientific). Le débit est de 300 nL min⁻¹. Pour les phases mobiles A et B, la première est faite d'eau 99,9 % et d'acide formique 0,1 % (Biosolve), la deuxième renferme l'acétonitrile 99,9 % et l'acide formique 0,1 % (Biosolve). Le gradient consiste en une augmentation linéaire de 2 à 55 % de la phase mobile B sur 30 min, suivie d'un accroissement rapide de 90 % en moins d'une minute. La composition est maintenue à 90 % pendant 10 min, puis diminuée à 2 % pour la rééquilibration de la colonne. Les masses sont trouvées grâce au logiciel Xcalibur 2.1 software. Les analyses complètes de la spectrométrie de masse sont acquises à haute résolution (FWMH 30.000) au moyen de l'analyseur Orbitrap. Le rapport masse sur charge (m / z) est de 400 à 2000. Les spectres induits par la collision de dissociation sont accordés sur les cinq ions les plus intenses dans le linéaire traps LTQ.

II-2-10-3- Recherche des protéines allergènes dans la base de données Uni-Prot

Les résultats fournis par la LC-MS/MS sont traités avec le logiciel Proteome Discoverer 1.4 software. Le moteur de recherche Mascot Server 2.4 (Science Matrice) compare les résultats obtenus avec ceux existants dans la base de données protéiques Uni-Prot (libérer 2015_01, Janvier 2015). Les recherches dans les banques de données sont faites à partir des peptides en prenant l'oxydation de la méthionine, l'iodoacétylation de la cystéine comme des modifications variables. La tolérance de masse est fixée à 10 ppm et 2 clivages manqués par la trypsine sont acceptés pour la recherche dans la banque de données. Pour les résultats de recherches, seules les protéines ayant un ion-score supérieur à 50 sont prises en compte. Il est utilisé le programme BLASTP dans le serveur Uni-Prot. Des comparaisons de séquences de différents allergènes analysés en MS/MS et identifiées dans ces bases de données sont effectuées.

II-2-11- Purification de la fraction protéique hydrosoluble de la farine délipidée d'arachide crue

II-2-11-1- Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75

Elle est réalisée sur une colonne en verre ayant un diamètre de 1,5 cm et une longueur de 120 cm liée à une pompe péristaltique (model IPC-12, Ismatec, France) et équilibrée avec de l'eau distillée. Le support a un domaine de fractionnement de 2 à 70 kDa. Le gel sous forme de poudre est mis à gonfler pendant 24 h dans l'eau distillée, dégazé puis coulé délicatement sur la paroi de la colonne. Il est lavé avec 3 volumes d'eau distillée. Le débit est 30 ml/h. Après rééquilibrage de la colonne, l'extrait protéique est filtré et 2ml sont déposés. L'élution est réalisée à température ambiante. Le débit est 30 ml/h. 2 ml /tube sont recueillies. Les protéines collectées sont dosées à $\lambda = 280\text{nm}$. Les fractions récupérées sont lyophilisées et conservées à -20°C .

II-2-11-2-Détermination des masses moléculaires relatives des fractions collectées par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75

Pour déterminer les masses moléculaires relatives des fractions collectées par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75 et récupérer les fractions d'intérêts purifiées, un volume de 2 ml du mélange composé des protéines témoins de masses moléculaires relatives (M_r) connues variant de 13,7 à 84 kDa (Sigma- Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA) indiquées dans le tableau N° 5 est déposé sur la colonne. Les protéines sont éluées comme décrit précédemment. La courbe de tendance représentée dans la figure N° 21 obtenue en traçant le volume d'élution (V_e) par rapport au volume mort (V_o) pour chaque protéine témoin en fonction du logarithme de la masse moléculaire relative ($\log M_r$) permet de calculer la M_r de chaque fraction protéique collectée.

II-2-12- Fractionnement des protéines de la fraction hydrosoluble purifiée par chromatographie échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Cellulose

La colonne utilisée est une colonne préparative de type DEAE-Cellulose (diamètre 2,5 cm : hauteur 50 cm) liée à une pompe péristaltique. Avant l'injection, elle est équilibrée avec un volume de tampon de fixation permettant d'éliminer les sels

Tableau N° 5: Protéines témoins utilisées pour la chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75

Protéines témoins	Masses moléculaires relatives (Mr) (kDa)
Gluthation peroxydase	84
Sérum albumin bovin	68
Gluthation Réductase	58
α - chymotrypsine	25
Ribonucléase A	13,7

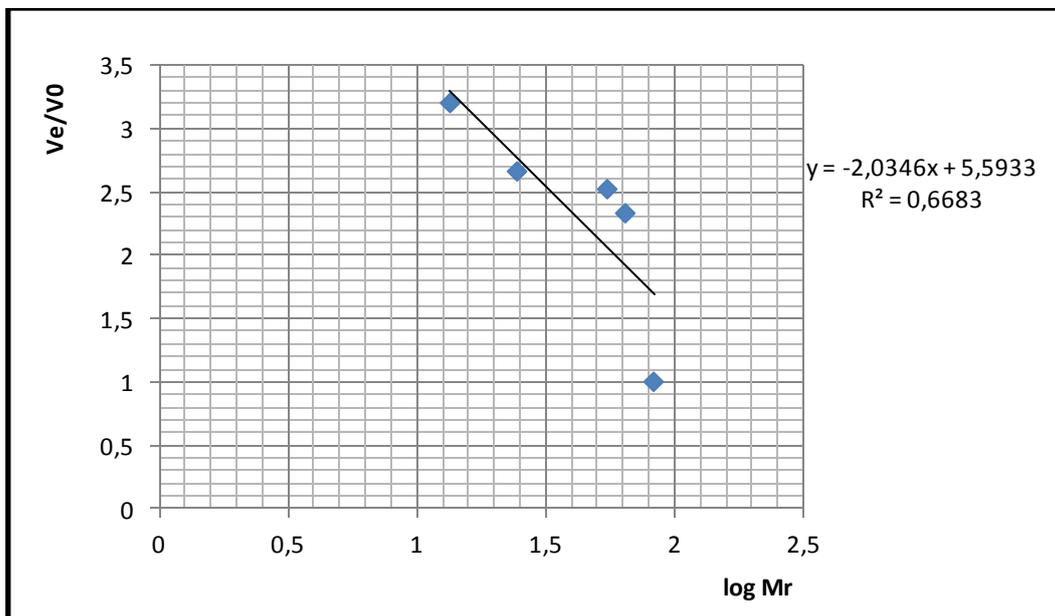


Figure N° 21: Courbe de tendance des protéines témoins éluées par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75

Y= V_e/V_0 : Volume d'élué/Volume mort

X = $\log Mr$: logarithme de la masse moléculaire relative

R² = Coefficient de détermination

Matériel et méthodes d'analyses

4 ml de la fraction d'intérêt préalablement purifiée par chromatographie de filtration sur gel de séphadex G-75 sont placées dans la colonne. L'élution est effectuée grâce à un gradient de NaCl 0-0,4 M dans un tampon Tris (0,02 M pH=8) à température ambiante (**Duan et al., 2013**). Le débit est de 2ml/min/tube. La mesure des absorbances des différentes fractions éluées est à $\lambda = 280$ nm.

Résultats et discussion

III- Résultats et discussion

III-1- Analyse des taux de protéines de la farine délipidée d'arachide

La figure N° 22 donne le taux de protéines totales et ceux de protéines non hydrosolubles et hydrosolubles de la farine délipidée de la légumineuse étudiée. Le taux de protéines totales et ceux de protéines non hydrosolubles et hydrosolubles est successivement 45,49 %, 36,65 % et 9,99 %. Les teneurs de protéines non hydrosolubles et hydrosolubles représentent 80,56 % et 20 % par rapport aux protéines totales respectivement. Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par la littérature (**Dutau et Rancé., 2001 ; Afify et al., 2011**). Cette denrée alimentaire est couramment consommée dans l'alimentation humaine dans le monde sous différentes formes : frite, bouillie, crue ou grillée. L'ingestion par certains individus des protéines ou de leurs peptides issus de la digestion peut engendrer des réactions allergiques.

III-2-Analyse protéomique pour déterminer les protéines de pHi acides à neutres de la fraction hydrosoluble de la farine délipidée d'arachide crue

Afin d'identifier les protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue, l'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate est réalisée. D'après la figure N° 23, une multitude de spots bien visibles numérotés de 1 à 28 s'échelonnent entre les Mr de 16 à 71 kDa et les pI > 3 et < 7. Il est retrouvé des protéines de pHi acides (par exemple le spot 4), des protéines de pHi acides proches de la neutralité (spot 11) et des protéines de pHi neutres (spot 19). Tous les spots protéiques séparés par électrophorèse bidimensionnelle (2D) sont identifiés par spectrométrie de masse LC/MS-MS et interrogation de la base de données Uni-Prot. Les spectres de masses (LC-MS) des spots ayant les scores protéiques les plus élevés sont montrés dans les figures de 24 à 30. Les masses sont confrontées à la base de données Uni-Prot. Le résultat de l'analyse en spectrométrie de masse tandem MS/MS sont répertoriés dans le tableau N° 6. Les spots analysés correspondent à l'Ara h1, l'Ara h2, l'Ara h3 et l'Ara h6. Ces protéines appartiennent à trois groupes différents. Il s'agit des albumines 2S, des globulines 7S et des globulines 11S. Les globulines sont des protéines solubles dans les solutions salines. Ces protéines ont probablement subi un processus d'hydrolyse

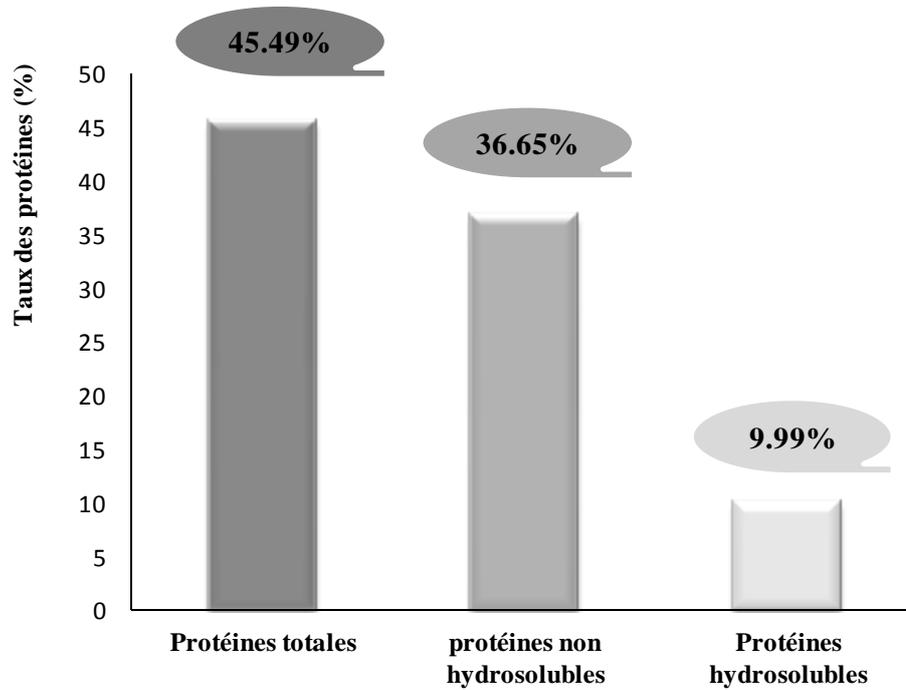


Figure N° 22: Taux de protéines totales, de protéines non hydrosolubles et de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide

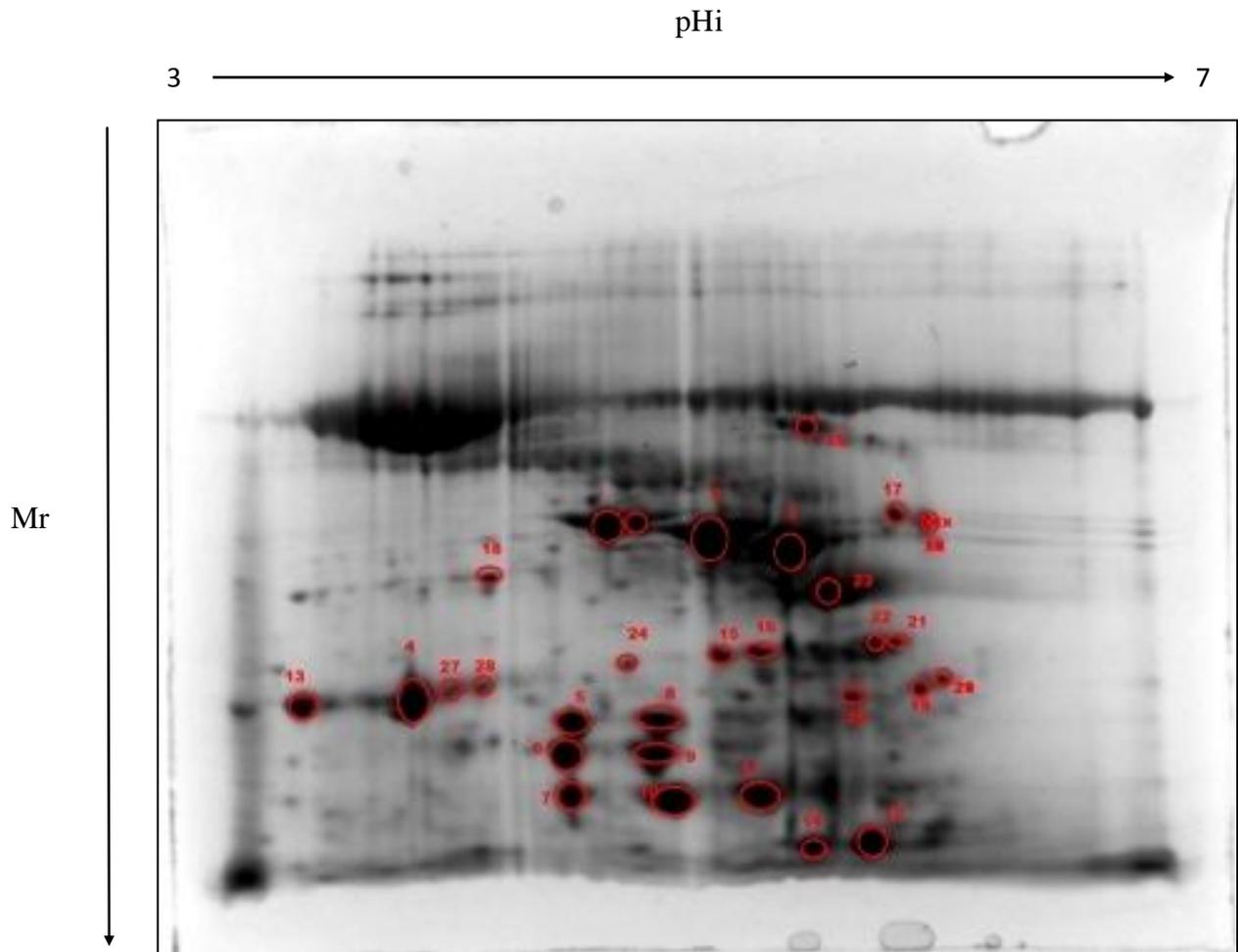


Figure N° 23: Carte de protéines hydrosolubles séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D) sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate de la farine d'arachide crue

Résultats et discussion

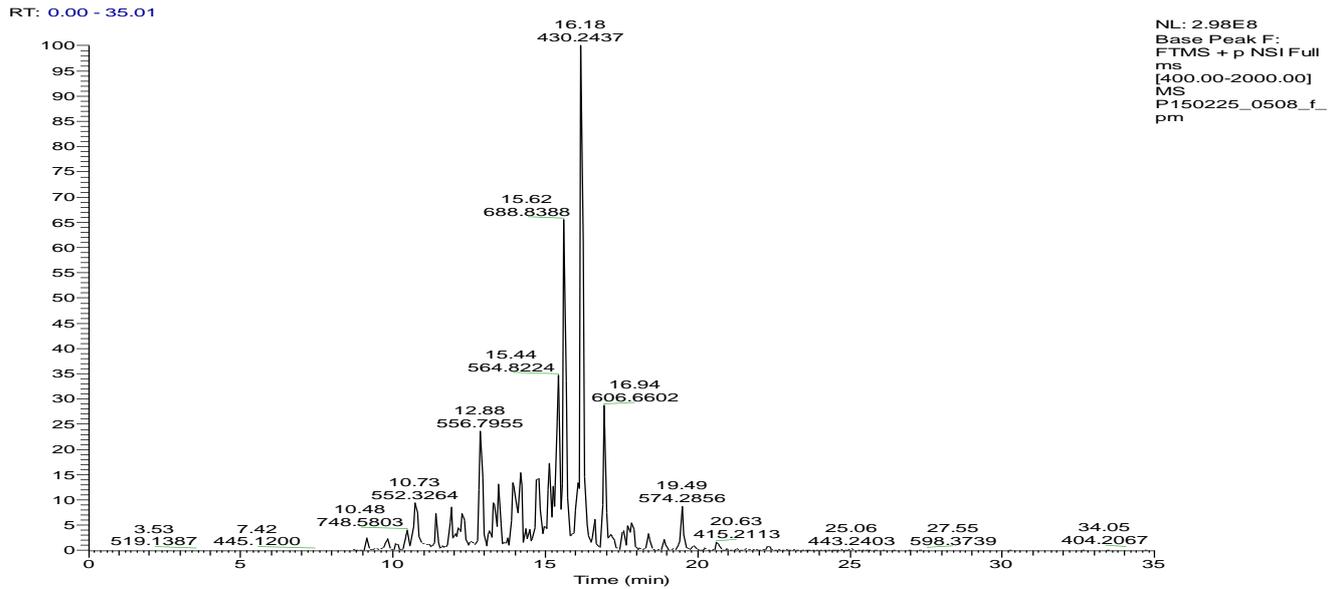


Figure N° 24 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 23 (Score : 1643,84) de l'isoforme P41B de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

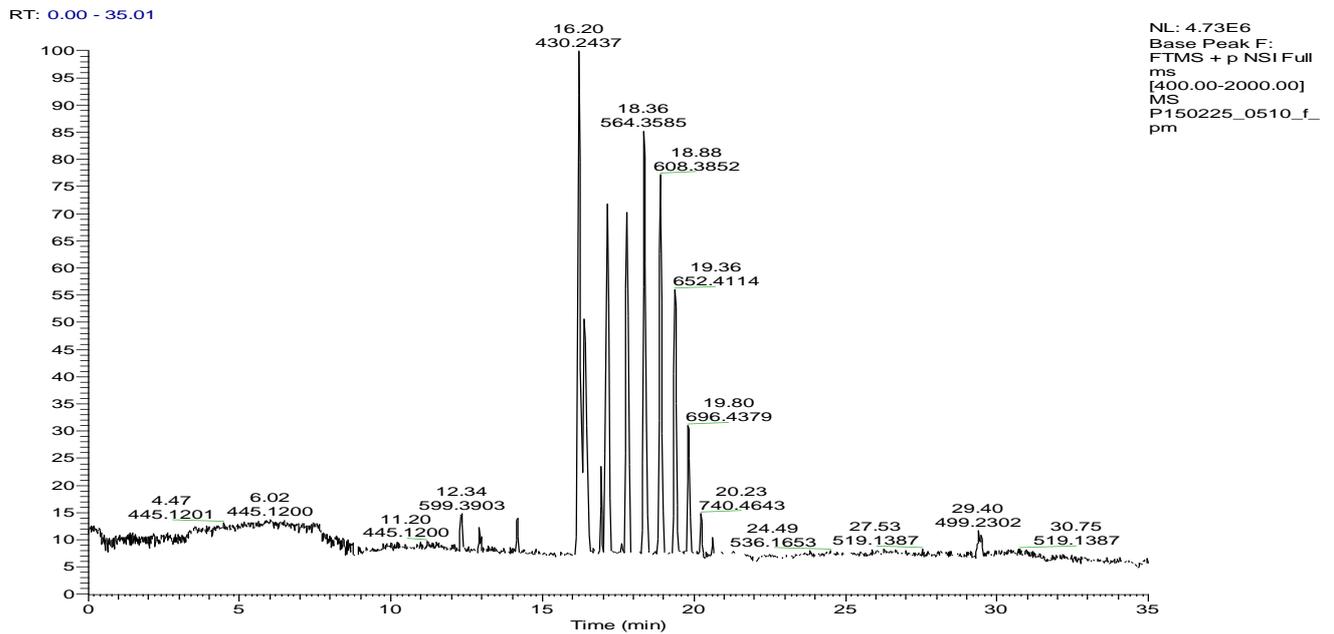


Figure N° 25 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 21 (Score: 278,08) de l'isoforme P17 de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

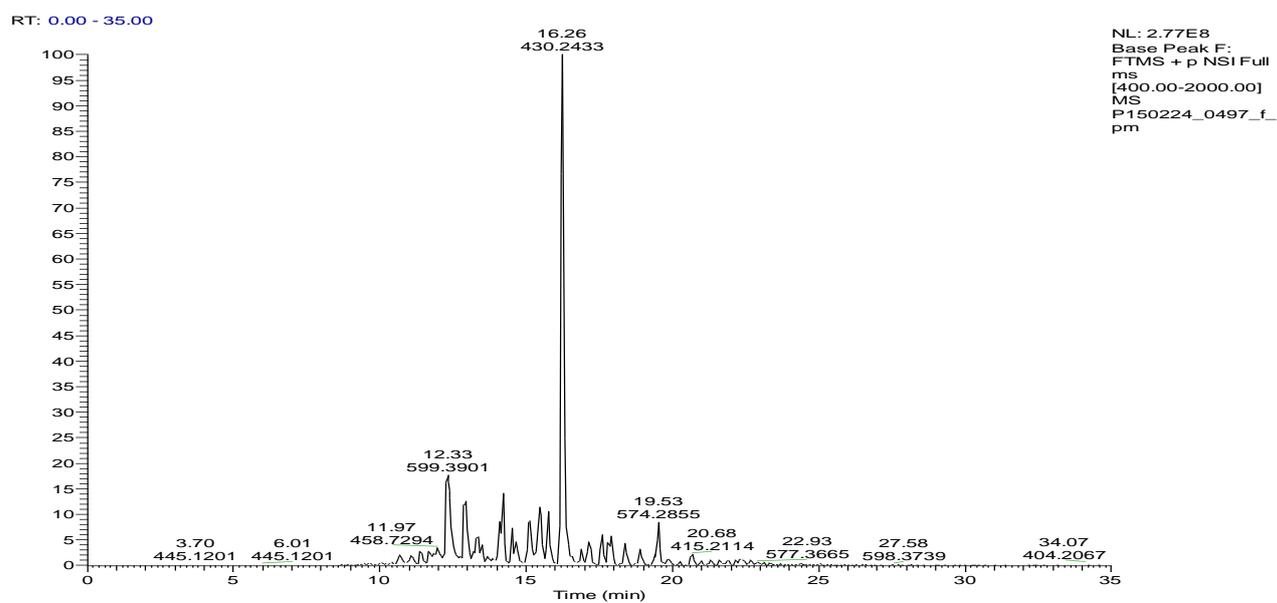


Figure N° 26 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 17 (Score: 62,26) de la conarachine monomère de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Résultats et discussion

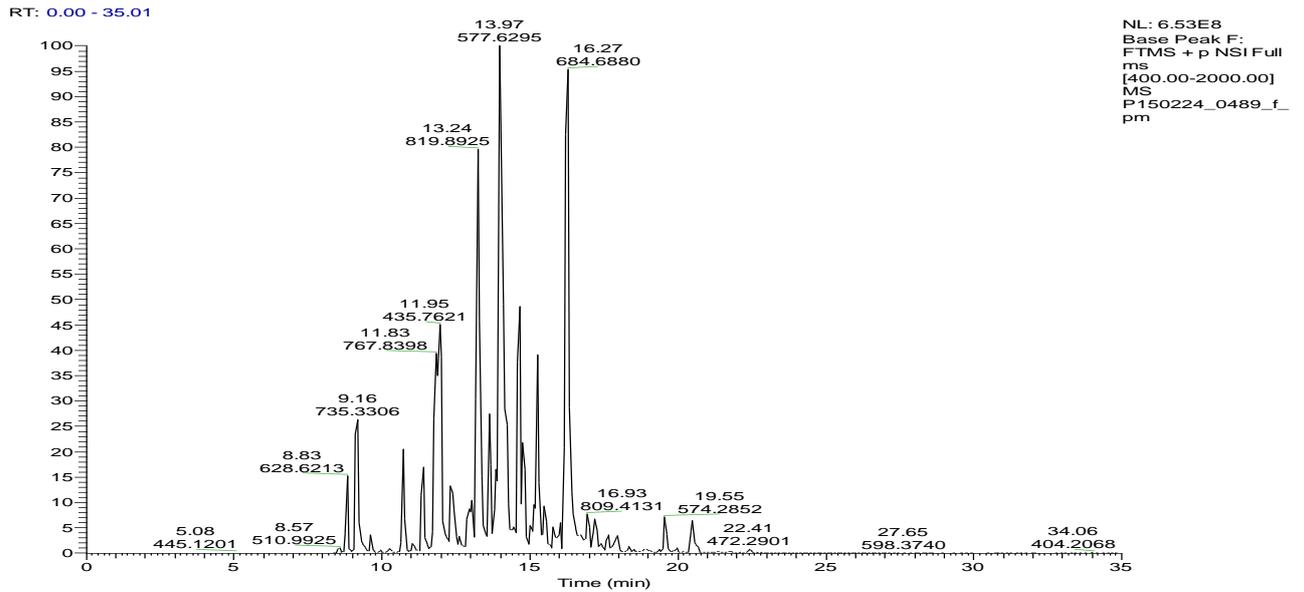


Figure N° 27: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 2 (Score: 1607,87) de la Gly 1 fragment d'Ara h3 (globuline 11S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

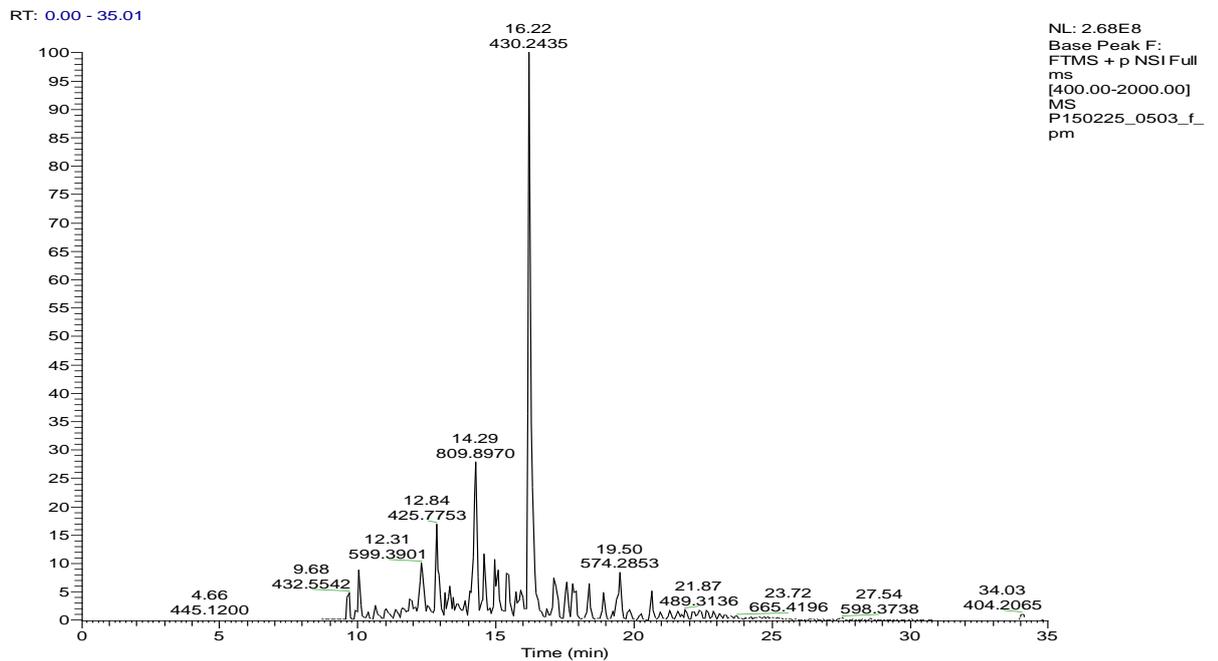


Figure N° 28: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 28 (Score: 130,74) de l'arachine Ahy-3OS fragment d'Ara h3 (globuline 11S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Résultats et discussion

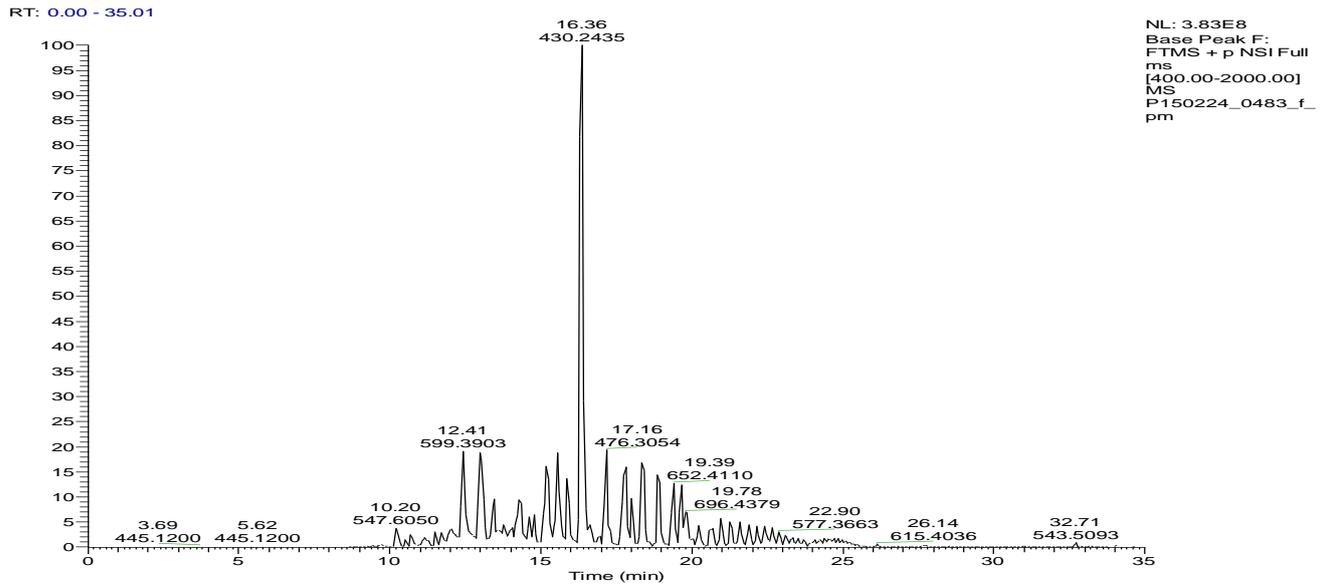


Figure N° 29 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 5 (Score: 74,77) de l'Ara h2 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

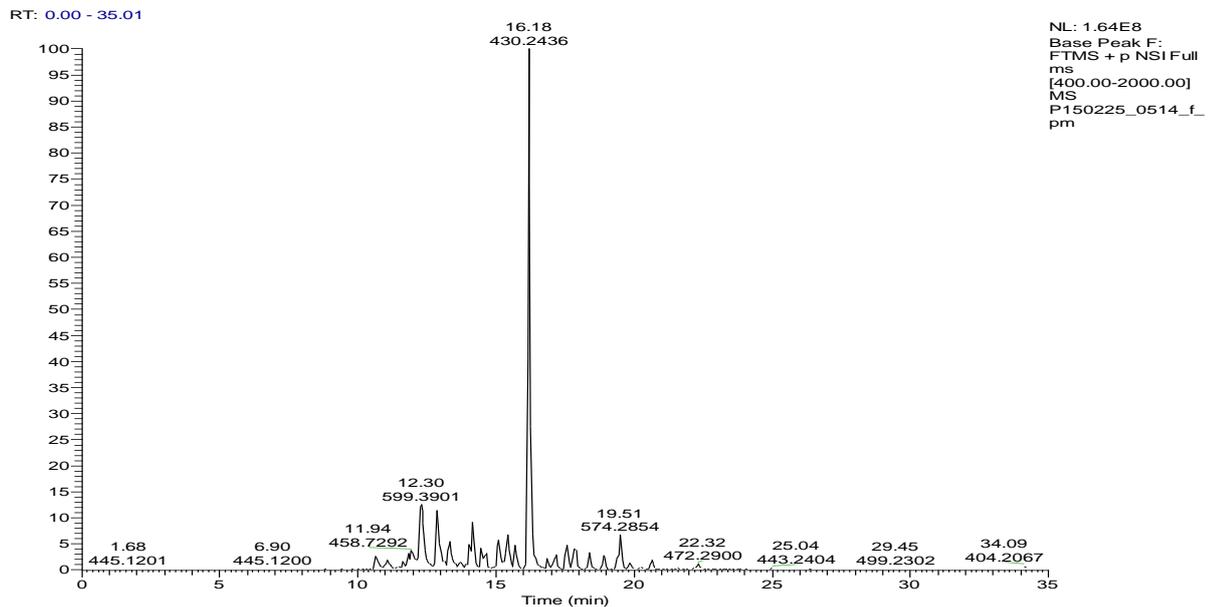


Figure N° 30: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) du spot N° 11 (Score: 454,49) de l'Ara h6 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Tableau № 6: Protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D) et identifiées par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot

Protéines	Numéros des spots	Numéros d'accessions	Mr (kDa)	pHi	Taux de Recouvrements (%)	Scores protéiques
Ara h3/ Ara h4 globuline 11S	1	Q8LKN1	61,7	5,72	36,80	1020,33
Gly1 (Ara h3) globuline 11S	2, 14, 18	Q9FZ11	60,41	5,64	63,33/31,57/23,06	1607,87/311,24/183,21
Glycinine (Ara h3) globuline 11S	3, 4, 15	Q6IWG5	58,02	5,59	45,29/50,39/20,59	789,06/710,96/116,27
Conglutine-7 (Ara h2) albumine 2S	5, 6	Q6PSU2	20,1	6,34	57,56/47,09	74,77/71,71
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	7, 8, 9, 10, 16, 19, 20, 23, 24, 25, 26	P43238	71,3	7,06	19,69/24,76/27,48/16, 13/26,84/16,13/12,78 /43,61/7,83/ 39,94/15,02	336,78/366,75/410,55/ 248,76/51,74/176,7/ 117,31/1643,84/153,39 /922,11/309,86
Isoforme P17 (Ara h1) globuline 7S	21, 22	P43237	70,24	6,85	26,22 /14,01	278,08/221,9
Conarachine (Ara h1) globuline 7S	17	Q6PSU3	66,53	7,17	34,83	62,26
Conglutine (Ara h6) albumine 2S	11, 12	Q647G9	16,9	6,52	51,03/24,14	454,49/194,98
Storage protein (Ara h3) globuline 11S	13	Q6T2T4	61,46	5,71	51,31	449,84
Arachine Ahy-3 OS (Ara h3) globuline 11S	27, 28	Q647H2	54,53	5,59	7,44/7,44	86,32/130,74

- **Mr** : Masse moléculaire relative
- **pHi** : pH- isoélectrique

naturelle à l'intérieur de la graine. Il est généré des fragments protéiques de faibles masses moléculaires solubles dans l'eau. Cela explique l'identification par spectrométrie de masse des globulines 7S et 11S dans l'extrait protéique. Par rapport aux spots, 14 contiennent l'Ara h1 protéine de la superfamille des cupines, protéine de réserve globuline 7S (**de Leon et al., 2007 ; Wichers et al., 2004**). 13 spots sont identifiés comme les isoformes P41B et P17 de l'Ara h1. 1 spot seulement correspond à la conarachine monomère de l'Ara h1. 10 spots révèlent l'Ara h3, protéine de la superfamille des cupines, protéine de réserve globuline 11S (**de Leon et al., 2007 ; Koppelman et al., 2003**). L'Ara h3/Ara h4, la storage protéine (Ara h3), la gly 1 (Ara h3), la glycine (Ara h3) et l'arachine Ahy-3 OS (Ara h3) sont contenues dans 1, 1, 3, 3 et 2 spots respectivement. L'Ara h2 et l'Ara h6 appartenant à la superfamille des prolamines, protéines de réserve albumines 2S (**Koppelman et al., 2003**) sont retrouvées chacune dans 2 spots. 2 spots représentent la conglutine-7 (Ara h2) et 2 autres marquent la conglutine (Ara h6). Il est distingué que le pHi de l'isoforme P17 (Ara h1) est acide et que ceux de l'isoforme P41B (Ara h1) et la conarachine (Ara h1) sont neutres. Dans le gel de polyacrylamide, ces trois entités moléculaires sont situées dans une zone de pHi acide tel les autres composés mis en évidence. Toutes les séquences en acides aminés des peptides sont données par rapport à la séquence protéique se trouvant dans la base de données Uni-Prot qui inclut le peptide signal.

III-3- Analyse des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)

Le diagramme électrophorétique représenté par la figure N° 31 montre que l'extrait protéique de la farine délipidée d'arachide crue présente plusieurs fractions bien distinctes de différentes intensités et de masses moléculaires relatives (Mr) variant de 16 à 71 kDa. Les bandes les plus intenses sont majoritaires. Elles ont des Mr de 37 kDa et de 60 kDa. Il existe un composant de 20 kDa. Les bandes moins intenses ont des Mr < 20 kDa et > 70 kDa. Ces résultats confirment ceux déterminés par électrophorèse bidimensionnelle. Toutes les fractions obtenues sont excisées du gel et identifiées par spectrométrie de masse et interrogation de la base de données Uni-Prot. Les spectres de masses obtenus par LC-MS ayant les scores protéiques les plus élevés sont donnés dans les figures numérotées de 32 à 37.

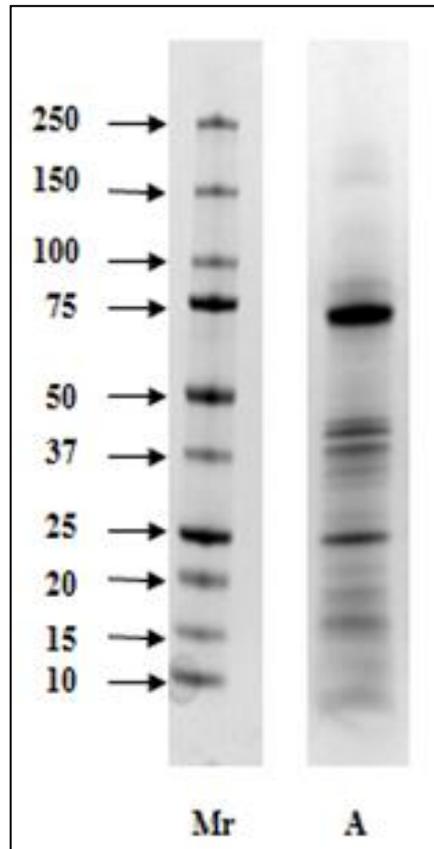


Figure N° 31: Diagramme des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)

Mr : Masses moléculaires relatives des protéines témoins (kDa)

A : Diagramme électrophorétique des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Résultats et discussion

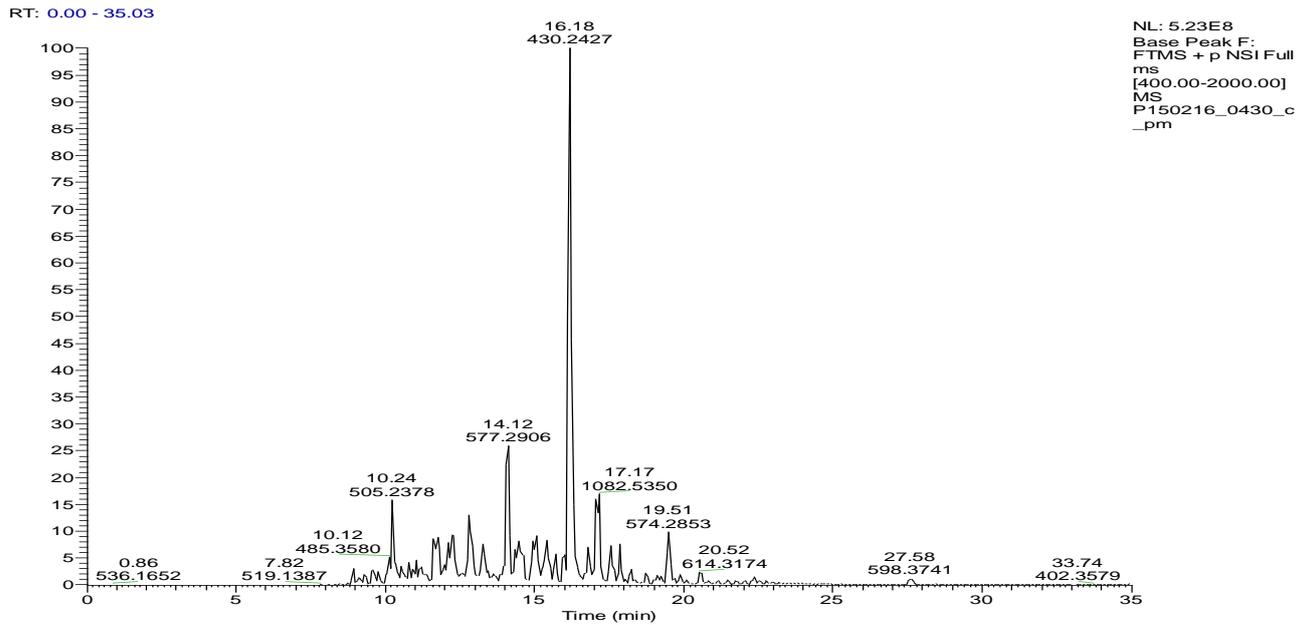


Figure N° 32 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 1 (Score: 1129,79) de l'isoforme P17 de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

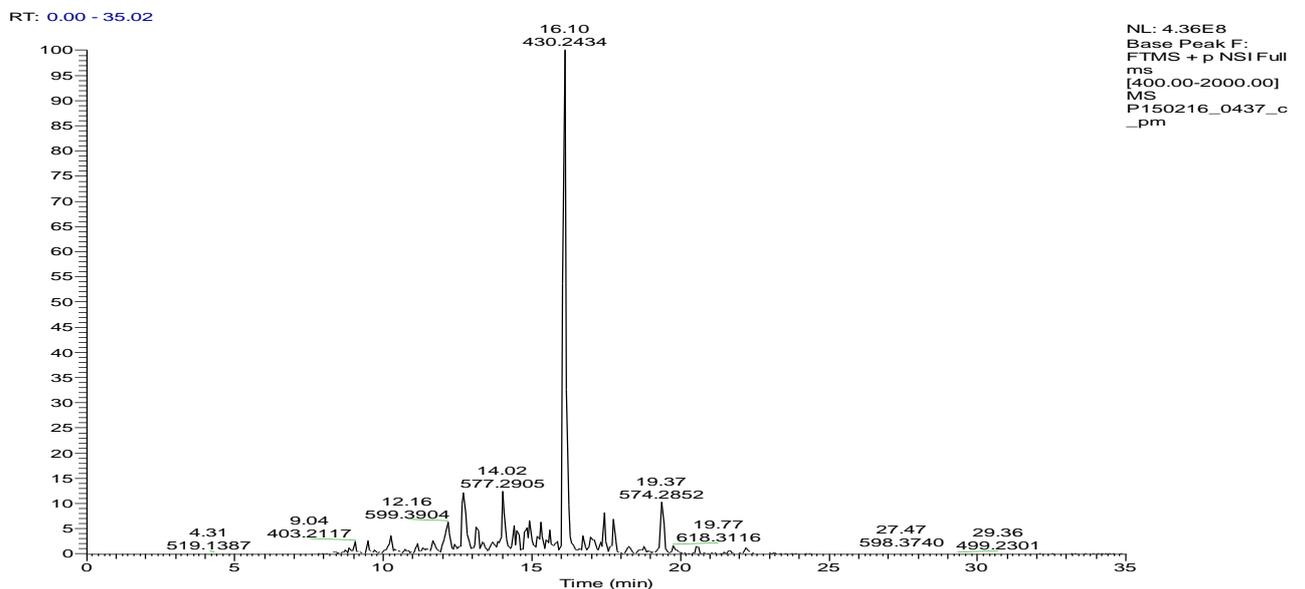


Figure N° 33: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 8 (Score: 2419,83) de l'isoforme P41B de l'Ara h1 (globuline 7S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

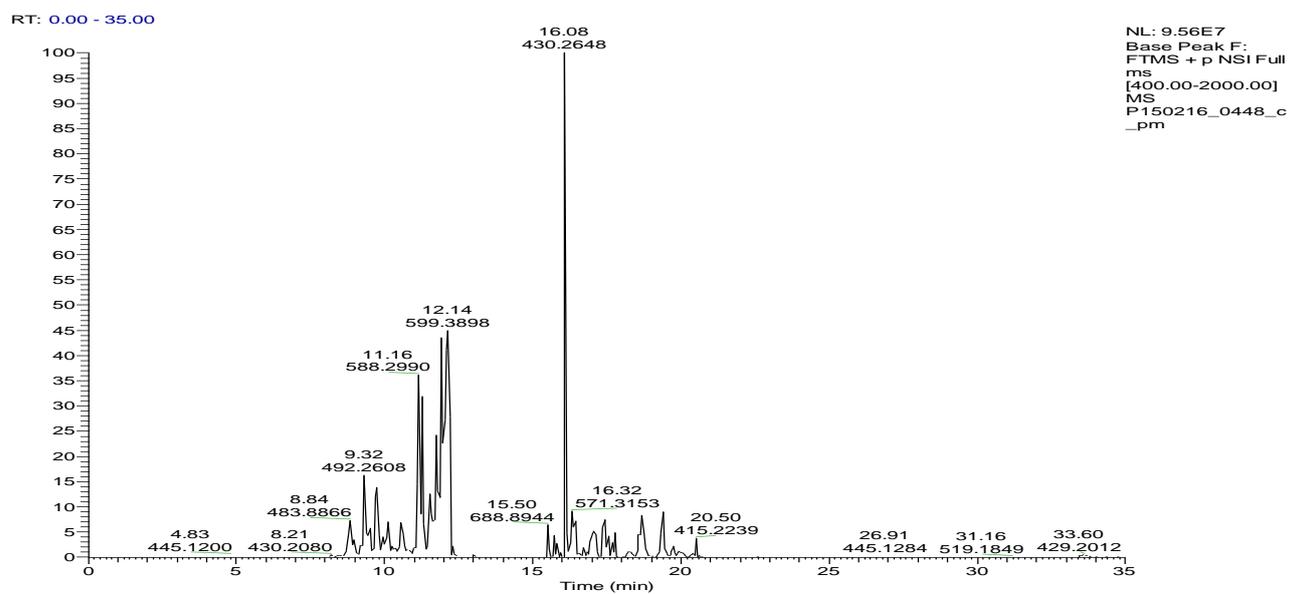


Figure N° 35: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 19 (Score: 246,73) de l'arachine Ahy 3-OS fragment d'Ara h3 (globuline 11S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Résultats et discussion

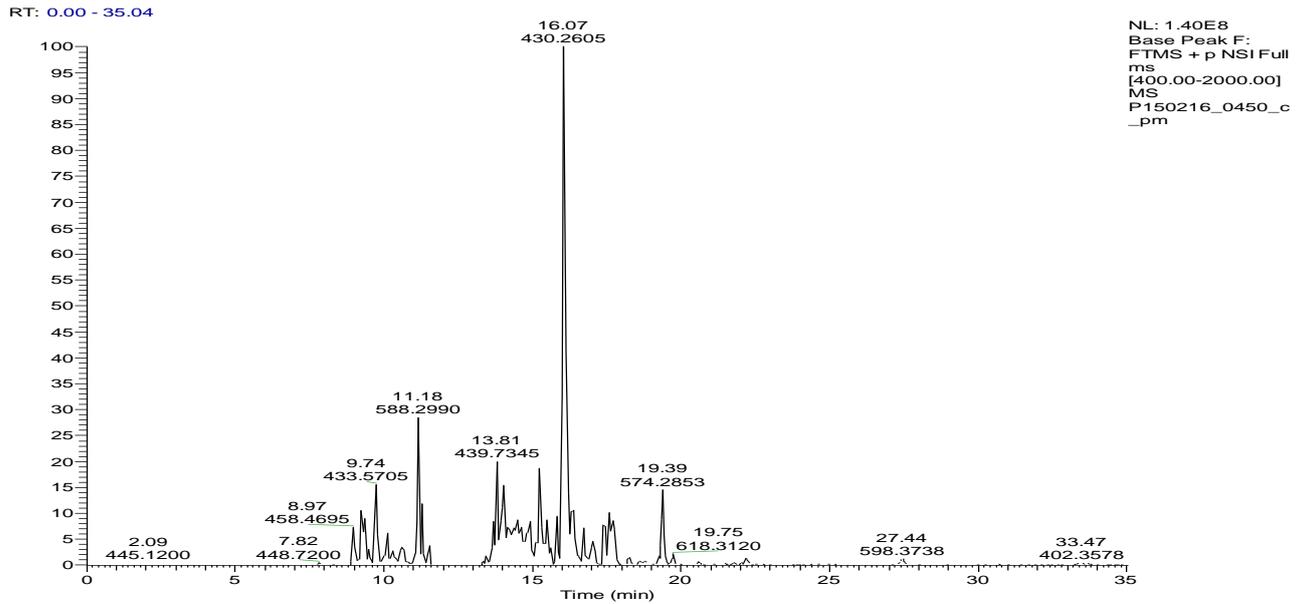


Figure N° 36 : Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 22 (Score: 342,44) de l'Ara h2 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

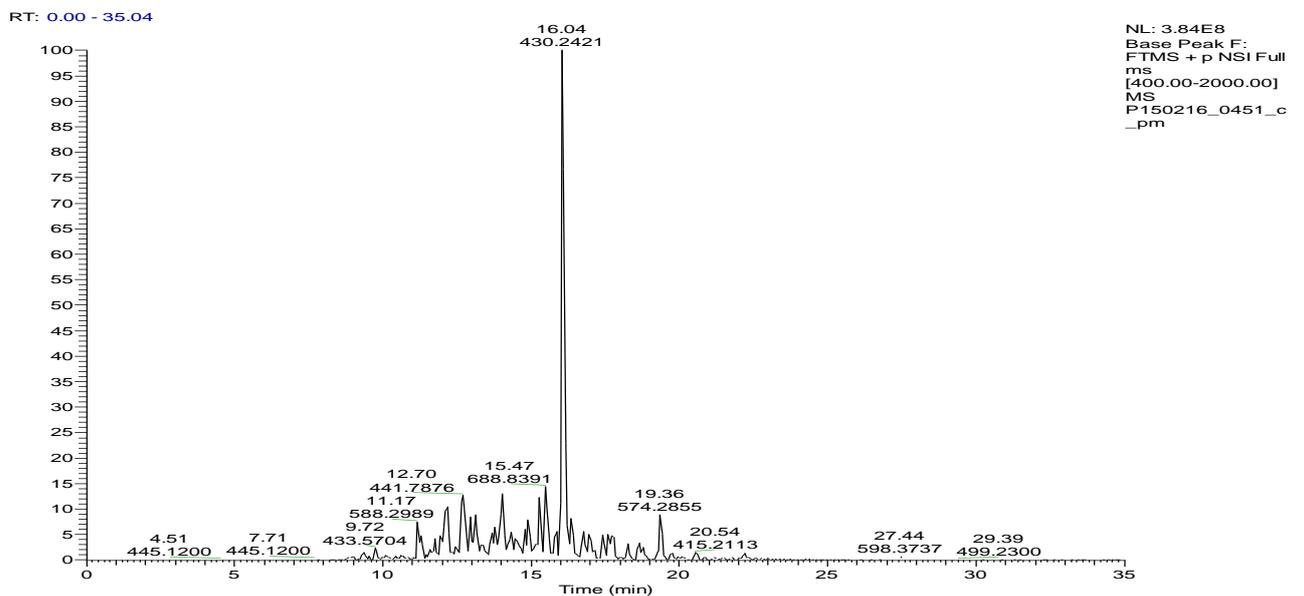


Figure N° 37: Spectre obtenu par spectrométrie de masse (LC-MS) de la fraction N° 23 (Score: 937,799) de l'Ara h6 (albumine 2S) de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Les résultats de l'analyse en spectrométrie de masse tandem MS/MS sont donnés dans le tableau № 7. D'après ces résultats, l'isoforme P17 (Ara h1), l'isoforme P41B (Ara h1), la conarachine (Ara h1), l'arachine Ahy-3 OS (Ara h3), la conglutine-7 (Ara h2) et la conglutine (Ara h6) sont déterminés successivement dans 3, 16, 1, 1, 1 et 3 bandes. Les fractions n° 14, n° 4, n° 7, n° 23, n° 19 et n° 22 identifiées comme recouvrant consécutivement 56.07 % de l'isoforme P41B (Ara h1), 51.14 % de l'isoforme P17 (Ara h1), 65.34 % de la conarachine (Ara h1), 66.90 % de la conglutine (Ara h6), 19.63 % de l'arachine Ahy-3 OS (Ara h3) et 16.86 % de la conglutine-7 (Ara h2) ont des scores considérables de 2210.53, 1498.30, 19.688.77, 937.79, 246.73 et 342.44. Les taux de recouvrement évalués pour les isoformes P41B (Ara h1) et P17 (Ara h1), la conarachine (Ara h1) et la conglutine (Ara h6) sont importants. Il est normal de constater des taux de recouvrement bas à l'exemple de l'arachine Ahy-3 OS (Ara h3) et la conglutine-7 (Ara h2) car les peptides peuvent résulter d'un seul fragment produit d'une hydrolyse naturelle évoquée par **Koppelman et al., 2003** de la protéine globale concrétisée par une bande électrophorétique. Les masses moléculaires relatives (Mr) de l'ensemble de ces molécules sont faibles. Elles varient de 16.9 kDa à 71.3 kDa. Par Swiss-Prot, il est identifié les isoformes P41B et P17 de l'Ara h1. **Wichers et al., 2004** ont identifiés par SDS-PAGE 1D une bande de 64 kDa renfermant les deux isoformes de l'Ara h1. La conglutine se trouve sous deux isoformes de faibles masses moléculaires de 16.9 kDa et 20.1 kDa et de pHi acides proches de la neutralité de 6.52 et 6.34. D'après **Burks et al., 1992**, il s'agit de l'Ara h2 et l'Ara h6.

III-4- Effet du grillage sur la résistance ou la sensibilité des protéines hydrosolubles d'arachide

Il est bien connu que pendant les traitements des aliments, les composants subissent plusieurs modifications chimiques et physiques. Les protéines soumises à des contraintes thermiques subissent des changements conformationnels (**Singh et al., 2013**). Avec l'augmentation de la température, il est admis que la dégradation de la structure tertiaire est suivie d'un dépliage réversible puis d'une perte de la structure secondaire (70-80°C), de la formation de nouvelles interactions intra-/inter-moléculaires (80-92°C) et de la formation d'agrégats (90-100°C) (**Davis et Williams., 1998**).

Tableau N° 7 : Identification des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue séparées par électrophorèse monodimensionnelle (1D) sur gel de polyacrylamide (TGX-12) en sodium dodécylsulfate par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot

Protéines	N° des fractions	Numéros d'accessions	Scores protéiques	Taux de recouvrements (%)	Mr (kDa)	pHi
Isoforme P17 (Ara h1) globuline 7S	1, 3, 4	P43237	1129,79/638,83/1498,30	47,42/27,52/51,14	70,24	6,85
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20	P43238	1308,54/517,46/1953,13/2419,83 1339,20/1152,25/1118,36/1147,57 1339,05/2210,53/2199,70/1178,72 794,20/545,51//496,26	48,56/18,37/55,43/55,43 49,68/45,69/45,85/50,48 48,24/56,07/50/43,77/40,26 22,68/51,05/39,30	71,3	7,07
Conarachine (Ara h1) globuline 7S	7	Q6PSU3	19688,77	65,34	66,53	7,17
Arachine -ahy3-OS (Ara h3) globuline 11S	19	Q647H2	246,73	19,63	54,53	5,59
Conglutine (Ara h6) albumine 2S	21, 23, 24	Q647G9	215,49/937,79/790,48	42,76/66,90/60	16,9	6,52
Conglutine-7 (Ara h2) albumine 2S	22	Q6PSU2	342,44	16,86	20,1	6,34

- **Mr** : Masse moléculaire relative
- **pHi** : pH- isoélectrique

Au cours des dernières années, plusieurs études ont été menées pour comprendre l'impact de différents traitements sur la conformation des protéines (Mills et al., 2009; Davis, Smales et James., 2001; Mondoulet et al., 2005 ; Singh, Orsat et Raghavan., 2012; Singh et al., 2013a, 2013b). Selon Chung et Champagne, 2003, à des températures élevées, des modifications chimiques provoquent la formation de liaisons covalentes entre les résidus lysine de la protéine et d'autres constituants de la matrice alimentaire conduisant à la formation d'adduits variés. La comparaison entre les diagrammes électrophorétiques des protéines hydrosolubles extraites de l'arachide crue et grillée (figure N° 38) permet de constater que plusieurs bandes ont disparu et d'autres sont devenues moins intenses après le traitement thermique effectué. Les fractions révélées après le grillage sont hydrolysées par la trypsine et identifiées par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et par interrogation de la base de données UniProt. L'isoforme P41B (Ara h1), la conarachine (Ara h1), la glycine (Ara h3) et la conglutine (Ara h6) déterminés sont indiqués dans le tableau N° 8.

III-5- Détermination des protéines allergènes hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Les immunoempreintes obtenues avec le sérum sont représentées dans la figure N° 39. Les 05 composants protéiques reconnus par les IgE spécifiques et identifiés par LC-MS/MS sont l'isoforme P41B (Ara h1) et la conarachine (Ara h1). Les allergènes trouvés sont indiqués dans le tableau N° 9. Dans le tableau N° 10 sont rapportées les différentes séquences en acides aminés des peptides trouvés. Les séquences en acides aminés sont données par rapport à celles existantes au niveau de la base de données UniProt. Les masses des peptides ainsi que les zones de recouvrement sont déterminées par le logiciel MASCOT. Il est connu que l'Allergie à l'arachide présente des formes cliniques et immunologiques différentes en fonction des zones géographiques à travers le monde. Les patients américains ont fréquemment des anticorps à l'Ara h1, l'Ara h2 et l'Ara h3 (56,7 % à 90 %) tandis que les allergiques espagnols reconnaissent ces trois allergènes moins fréquemment (16 %-42 %). Ces derniers sont souvent sensibles à l'Ara h9 (Vereda et al., 2011). La sensibilisation à LTP (Ara h9) est principalement rencontrées chez méditerranéens (Krause et al., 2009).

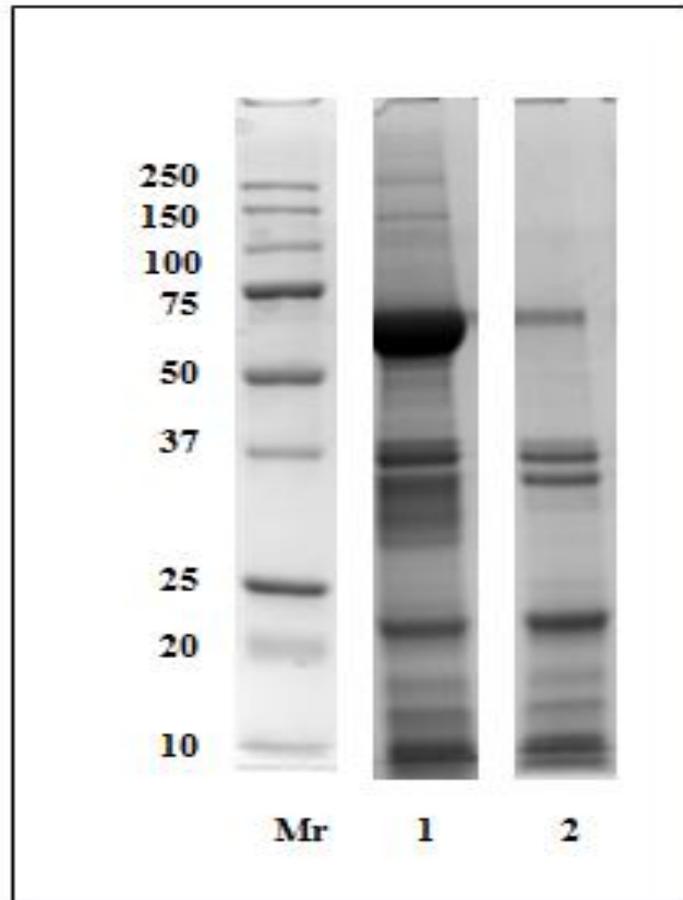


Figure N° 38: Diagrammes des protéines hydrosolubles d'arachide crue et grillée séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE)

Mr : Masses moléculaires relatives des protéines témoins (kDa)

1 : Diagramme électrophorétique des protéines hydrosolubles de l'arachide crue

2 : Diagramme électrophorétique des protéines hydrosolubles de l'arachide grillée

Tableau N° 8: Identification des protéines hydrosolubles de l'arachide grillée à 140°C pendant 40 min par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot

Protéines	Numéros de fractions	Numéros d'accessions	Scores protéiques	Taux de recouvrements (%)	Mr (kDa)	pHi
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	1, 4, 9	P43238	124,33/71,62/ 69,23	41,49/38,66/ 35,14	71,3	7,06
Conarachine (Ara h1) globuline 7S	3, 11	Q6PSU3	63,09/53,15	29,83/30,34	66,53	7,16
Glycinine (Ara h3) globuline 11S	16	Q6IWG5	53,15	25,88	58,02	5,59
Conglutine (Ara h6) albumine 2S	28	Q647G9	137,31	68,97	16,9	6,52

- **Mr** : Masse moléculaire relative
- **pHi** : pH- isoélectrique

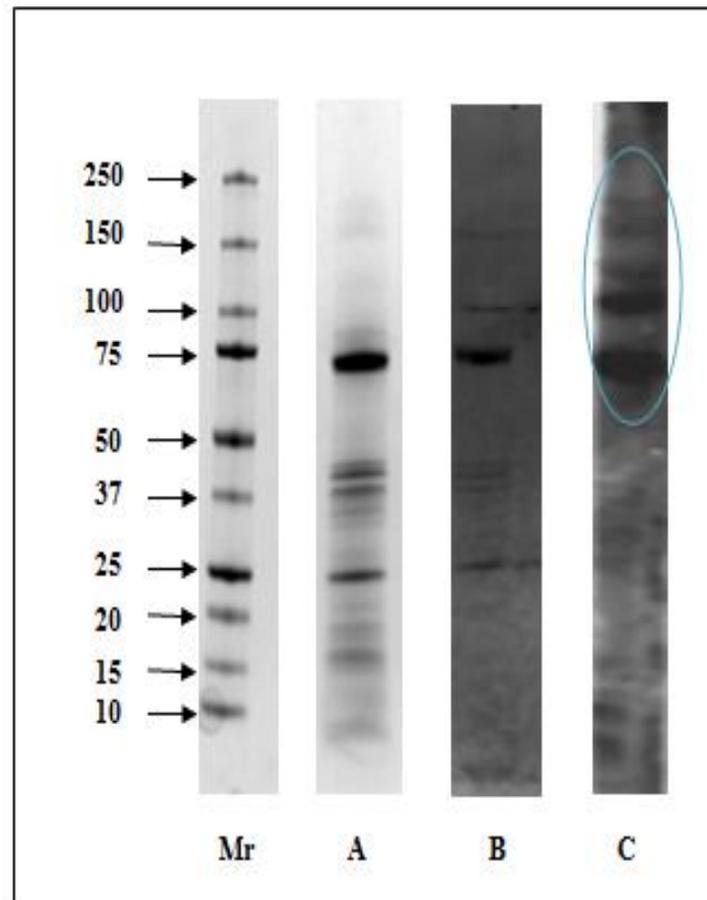


Figure N° 39: Immunoempreintes (1D) des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

Mr : Masses moléculaires relatives des protéines témoins (kDa)

A : Diagramme électrophorétique des protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue

B : Transfert des protéines hydrosolubles sur membrane de nitrocellulose

C : Révélation des protéines hydrosolubles reconnues par les IgE spécifiques du sérum de la patiente

Tableau N° 9: Protéines allergènes de la fraction hydrosoluble de la farine délipidée d'arachide crue identifiées par spectrométrie de masse LC-MS/MS et par interrogation de la base de données Uni-Prot

Protéines allergènes	Numéros des bandes	Numéros d'accessions	Scores protéiques	Taux de recouvrements (%)	Mr (kDa)	pHi
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	1, 2, 3	P43238	197/286/273	53,51/51,12/51,92	71,3	7,06
Conarachine (Ara h1) globuline 7S	4, 5	Q6PSU3	166/232	46,90/53,97	66,0	7,16

- **Mr** : Masse moléculaire relative
- **pHi** : pH- isoélectrique

Tableau N° 10: Séquences en acides aminés des peptides des protéines allergènes déterminées de l'arachide crue

Protéines allergènes	Numéros des fractions	Séquence en acides aminés des peptides des protéines allergènes	Positions	Masses moléculaires relatives (Mr) (Da)
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	1	RVLLEENAGGEQEER	344-348	1728,849
		IFLAGDKDNVIDQIEK	541-556	1817,969
		KSFNLDEGHALR	254-265	1386,711
		DQSSYLQGFSR	308-318	1287,596
		KGSEEEGDITNPINLR	386-401	1771,882
		HADADNILVIQQGQATVTVANGNNRK	229-254	2619,328
		IVQIEAKPNTLVLPK	224-238	1663,017
		GRREEEEDDEEEEGSNR	478-495	2193,876
		SSENEGIVVK	357-367	1175,590
		VSKEHVEELTK	368-378	1298,695
		NNPFYFPSR	172-180	1141,542
		EGEPDLSNFGK	402-413	1306,592
		EGALMLPHFNSK	440-451	1343,679
		AMVIVVVNKG TGNLELVA VR	452-471	2082,215
		IPSGFISYLNR	266-277	1379,768
		VAKISMPVNTPGQFEDFFPASSR	285-307	2541,246
		NTLEAAFNAEFNEIRR	319-334	1894,938
		LFEVKPDKK	414-422	1103,646
		NPQLQDLDMMLTCVEIK	423-439	2063,988
		GRQPGDYDDDR	94-105	1449,645
QAKDLAFPGSGEQVEK	575-572	1703,858		
EGEQEWGTPGSHVREETSR	153-161	2170,972		
EREREEDWR	122-130	1304,597		
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	2	RVLLEENAGGEQEER	122-130	1728,853
		KGSEEEGDITNPINLR	386-401	1771,885
		IVQIEAKPNTLVLPK	224-238	1663,017
		IFLAGDKDNVIDQIEK	541-556	1817,967
		ISMPVNTPGQFEDFFPASSR	288-307	2243,048
		CLQSCQQEPDDLKQK	42-56	1876,850
		KSFNLDEGHALR	254-265	1386,712
		VSKEHVEELTK	368-378	1298,693
		DQSSYLQGFSR	308-318	1287,597
		GRQPGDYDDDR	99-104	1293,545
		SSENEGIVVK	357-367	1175,590

Résultats et discussion

		EGALMLPHFNSK DLAFPGSGEQVEK EGEPDLSNFGK AMVIVVVK HADADNIVIQGGQATVTVANGNNRK IPSGFISYLNR QFQNLQNR LFEVKPDKK GTGNLELVAVRK NTLEAAFNAEFNEIRR EGEQEWGTPGSHVREETS EREREEDWR NNPFYFPSRR	440-451 560-572 402-413 452-460 229-254 266-277 215-223 414-422 461-472 319-334 153-161 122-130 172-180	1343,679 1376,669 1306,591 972,590 2747,423 1379,767 1184,592 1103,644 1256,733 1894,939 2170,975 1304,598 1297,644
Isoforme P41B (Ara h1) globuline 7S	3	NPQLQDLDMMLTCVEIK RVLLEENAGGEQEER ISMPVNTPGQFEDFFPASSR IFLAGDKDNVIDQIEK KGSEEEGDITNPINLR IVQIEAKPNTLVLPK KSFNLDEGHALR EGEQEWGTPGSHVR VSKEHVEELTK GRREEEEDDEEEEGSNR DQSSYLQGFSR EGALMLPHFNSK DLAFPGSGEQVEK EREREEDWR EGEPDLSNFGK HADADNIVIQGGQATVTVANGNNRK AMVIVVVK GTGNLELVAVR GRQPGDYDDRR IPSGFISYLNR LFEVKPDKK NTLEAAFNAEFNEIRR SSENEGVIK NNPFYFPSRR	423-439 334-348 288-307 541-556 386-401 224-238 254-265 153-166 368-378 478-495 308-318 440-451 560-572 122-130 402-413 229-254 452-460 461-471 94-105 266-277 414-422 319-334 357-367 172-181	2063,985 1728,853 2243,046 1817,967 1771,885 1663,019 1386,712 1568,710 1298,695 2193,876 1287,597 1359,672 1376,671 1304,597 1306,591 2747,419 972,590 1128,636 1449,645 1379,768 1103,645 1894,938 1175,590 1297,644
Conarachine (Ara h1) globuline 7S	4	IFLAGDKDNVIDQIEK RVLLEENAGGEQEER KGSEEEEDITNPINLR EGEQEWGTPGSEVR IVQIEARPNTLVLPK	538-553 328-342 380-394 147-160 208-222	1817,968 1728,855 1714,865 1560,695 1691,024

Résultats et discussion

		DQSSYLQGFSR	302-312	1287,597
		KSFNLDEGHALR	248-259	1386,711
		DLAFPGSGEQVEK	557-569	1376,670
		ISMPVNTPGQFEDFFPASSR	282-301	2243,057
		SKQFQNLQNHR	197-207	1399,718
		EGALMLPHFNSK	432-443	1343,678
		SSDNEGVIVK	351-360	1047,530
		DGEPDLSNNFGR	394-405	1320,581
		GTGNLELVA VR	453-463	1128,636
		VSKEHVQELTK	361-371	1297,710
		IPSGFISYLNR	260-271	1379,768
		AMVIVVVNK	444-452	972,590
		NTLEAAFNAEFNEIRR	313-328	1894,941
		LFEVKPDKK	406-414	1103,644
		GRQPGDYDDRR	88-99	1449,645
		NNPFYFPSRR	166-175	1297,644
		EREEDWR	118-124	1019,453
Conarachine (Ara h1) globuline 7S	5	RVLLEENAGGEQEER	328-342	1728,853
		IFLAGDKDNVIDQIEK	538-353	1817,968
		ISMPVNTPGQFEDFFPASSR	282-301	2243,053
		KGSEEDITNPINLR	380-394	1714,864
		IVQIEARPNTLVLPK	208-222	1691,024
		HADADNILVIQQGQATVTVANGNNRK	223-248	2747,426
		NPQLQDLDMMLTCVEIK	415-431	2079,980
		KSFNLDEGHALR	248-259	1386,712
		DQSSYLQGFSR	302-312	1287,596
		DLAFPGSGEQVEK	557-569	1376,671
		SKQFQNLQNHR	197-207	1399,718
		EGALMLPHFNSK	432-443	1359,672
		SSDNEGVIVK	351-360	1047,531
		VSKEHVQELTK	361-371	1297,710
		DGEPDLSNNFGR	394-405	1320,581
		EGEQEWGTPGSEVREETS R	147-165	2162,962
		IPSGFISYLNR	260-271	1379,768
		LFEVKPDKK	406-414	1103,645
		NNPFYFPSRR	166-175	1297,643
		AMVIVVVNKGTGNLELVA VR	444-463	2082,211
		NTLEAAFNAEFNEIRR	313-328	1894,940
		GRQPGDYDDRR	88-99	1449,644

Trendelenburget al., 2014 ont montré que chez les nourrissons et les jeunes enfants ayant un eczéma sensibilisés à l'arachide, les IgEs à l'Ara h1, l'Ara h2 et l'Ara h3 sont le plus souvent détectées. L'analyse de l'immunoréactivité montre que l'isoforme P41B de l'Ara h1 et la conarachine monomère de l'Ara h1 sont ceux qui réagissent avec les IgEs de la patiente. Fait intéressant, il n'y a pas de sensibilisation aux allergènes majeurs connus, l'Ara h6 (albumine 2S) et l'Ara h3 (globuline 11S) décrits et répertoriés par l'IUIS (International Union Immunological Societies : <http://www.allergen.org>). Il est observé le plus souvent une co-sensibilisation à pratiquement tous les allergènes majeurs. La sensibilisation à un seul allergène de l'arachide est relativement rare (**Mondoulet, 2005**). Le résultat pour l'Ara h2 ne suit pas la réponse IgEs=31.20 KU/L établi par dosage immuno-enzymatique car les polypeptides provenant de l'hydrolyse naturelle de cette biomolécule ne renferment pas d'épitopes permettant la liaison IgEs-Ara h2.

III-6- Prédiction des épitopes de l'isoforme P41B et la conarachine reconnus par les IgE spécifiques

Les fragments spécifiques de l'allergène reconnus par les IgE spécifiques sont appelées épitopes. Ces derniers sont des segments linéaires contigus d'acides aminés ou des motifs de structure tridimensionnelle qui réticulent avec les IgEs. Les alignements des séquences en acides aminés des isoformes P41B et P17 ainsi que ceux de l'isoforme P41B et la conarachine sont présentés dans les figures N° 40 et N° 41 respectivement. L'isoforme P41B et l'isoforme P17 ainsi que l'isoforme P41B et la conarachine partagent 95 % et 96 % d'identité respectivement. D'après les alignements, l'isoforme P41B et la conarachine ont un nombre remarquable de peptides distinctifs par rapport à ceux ayant permis l'identification de l'isoforme P17 (tableau N° 11). 06 et 02 séquences peptidiques sont successivement communes aux bandes révélées par immunoempreintes l'isoforme P41B et la conarachine (tableau N° 12). D'après ces résultats, il est constaté que les fragments présents dans les bandes immunoréactives, Fi= LFEVKPDKK résulte de l'hydrolyse trypsique des liaisons peptidiques dans lesquelles la lysine de Fd= EGEPDLSNNFGK et l'arginine de Fp= DGEPDLSNNFGR de la conarachine engagent leur groupement carboxyle. Fh= SSENNEGVIVK et Fc= EHVEELTK spécifiques de l'isoforme P41B sont issus de Fhc= NEGVIVKSKEHVEELTK après action de la trypsine. Il est démontré que

Résultats et discussion

Query	1	MRGRVSPMLLLGI LVLASVSATHAKSPYQKKTENPCAQR CLQSCQQE PDDLKQK ACES 60 MRGRVSPMLLLGILVLASVSAT AKS PY +KTENPCAQRCLQSCQQE PDDLKQKACES	
Sbjct	1	MRGRVSPMLLLGI LVLASVSATQAKS -PY-RKTENPCAQR CLQSCQQE PDDLKQK ACES 58	
Query	61	RCTKLEYDPRCVYDPRGHTGT'TNQRS PPGERTR GRQPGDYDDRRQ PRREEGGRWGPAGP 120 RCTKLEYDPRCVYD TG TNQR PPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAP	
Sbjct	59	RCTKLEYDPRCVYD---TGATNQRHPPGERTR GRQPGDYDDRRQ PRREEGGRWGPAP 114	
Query	121	REREREEDWRQ PREDWRR PSHQQ PRKIRPEGRE GEQEWGTPGSHVREETSRNNPFYF PSR 180 REREREEDWRQ PREDWRR PSHQQ PRKIRPEGREGEQEWGTPGS VREETSRNNPFYFPSR	
Sbjct	115	REREREEDWRQ PREDWRR PSHQQ PRKIRPEGRE GEQEWGTPGSEVREETSRNNPFYF PSR 174	
Query	181	RFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRSR QFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVL PKHADADNILVIQQ 240 RFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRS+QFQNLQNHRIVQIEA+PNTLVLPKHADADNILVIQQ	
Sbjct	175	RFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQRS KQFQNLQNHRIVQIEARPNTLVL PKHADADNILVIQQ 234	
Query	241	GQATVTVANGNNRKSFNLD EGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFED 300 GQATVTVANGNNRKSFNLD EGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFED	
Sbjct	235	GQATVTVANGNNRKSFNLD EGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFED 294	
Query	301	FFPASSRDQSSYLQGF SRNTLEAAFNAEFNEIRRVLEENAGGEQEERQRRWSTRSSEN 360 FFPASSRDQSSYLQGF SRNTLEAAFNAEFNEIRRVLEENAGGEQEERQRR STRSS +	
Sbjct	295	FFPASSRDQSSYLQGF SRNTLEAAFNAEFNEIRRVLEENAGGEQEERQRRSTRSS-D 353	
Query	361	NEGVIVKVSKEHVEELTK HAKSVSKKGSEEGDITNPINLREGEPDLSNNFGKLFVVKPD 420 NEGVIVKVSKEHV+ELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPINLR+GEPDLSNNFG+LFVVKPD	
Sbjct	354	NEGVIVKVSKEHVQELTK HAKSVSKKGSEEG-DITNPINLRDGEPPDLSNNFGR LFVVKPD 412	
Query	421	KKNPQLQDLDMMLTCVEI KEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGR 480 KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGR	
Sbjct	413	KKNPQLQDLDMMLTCVEI KEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGR 472	
Query	481	E---EEEDEDEEEG SNREVRRYTARLKEGDVFI MPAAHPVAI NASSELHLLGFGINAEN 537 E EEE+EDEEEG SNREVRRYTARLKEGDVFI MPAAHPVAI NASSELHLLGFGINAEN	
Sbjct	473	EQEWEEEEEDEEEG SNREVRRYTARLKEGDVFI MPAAHPVAI NASSELHLLGFGINAEN 532	
Query	538	NHRI FLAGDKDNVIDQIE KQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQKESHFVSARPQSQSPSPS 597 NHRIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQK+ESHFVSARPQSQS S	
Sbjct	533	NHRI FLAGDKDNVIDQIE KQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQKRESHFVSARPQSQSPS---- 588	
Query	598	EKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN 626 SPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN	
Sbjct	589	---SPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN 614	

Figure № 40: Alignements des séquences en acides aminés des isoformes P41B et P17 de l'Ara h1

Query : Isoforme P41B, **Sbjct** : Isoforme P17

Résultats et discussion

Query	1	MRGRVSPMLLLLGILVLASVSATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACES	60
		MRGRVSPMLLLLGI LVLASVSAT AKS PY +KTENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACES	
Sbjct	1	MRGRVSPMLLLLGILVLASVSATQAKS - PY - RK TENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACES	58
Query	61	RCTKLEYDPRCVYDPRGHTGT'TNQRSPPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAGP	120
		RCTKLEYDPRCVYD TG TNQR PPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAP	
Sbjct	59	RCTKLEYDPRCVYD --- TGATNQRHPPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREEGGRWGPAP	114
Query	121	REREREEDWRQPREDWRRPSHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSHVREETSRNPPFYFPSR	180
		REREREEDWRQPREDWRRPSHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGS VREETSRNPPFYFPSR	
Sbjct	115	REREREEDWRQPREDWRRPSHQQPRKIRPEGREGEQEWGTPGSEVREETSRNPPFYFPSR	174
Query	181	RFSTRYGNQNGRIRVLQRFQDQSRQFQNLQNHRI VQIEAKPNTLVLPKHADADN ILVIQQ	240
		RFSTRYGNQNGRIRVLQRFQDQRS+QFQNLQNHRI VQIEA+PNTLVLPKHADADN ILVIQQ	
Sbjct	175	RFSTRYGNQNGRIRVLQRFQDQSRKQFQNLQNHRI VQIEARPNTLVLPKHADADN ILVIQQ	234
Query	241	GQATVTVANGNNRKSFNLDDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFED	300
		GQATVTVANGNNRKSFNLDDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFED	
Sbjct	235	GQATVTVANGNNRKSFNLDDEGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFED	294
Query	301	FFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAAFNEIRRVLLEENAGGEQEERGQRRWSTRSEN	360
		FFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAAFNEIRRVLLEENAGGEQEERGQRR STRSS +	
Sbjct	295	FFPASSRDQSSYLQGFSRNTLEAAFNAAFNEIRRVLLEENAGGEQEERGQRRSTRSS-D	353
Query	361	NEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPI NLRGEPDLSNNFGKLFVVKPD	420
		NEGVIVKVSKEHV+ELTKHAKSVSKKGSEEGDITNPI NLR+GEPDLSNNFG+LFVVKPD	
Sbjct	354	NEGVIVKVSKEHVQELTKHAKSVSKKGSEEG-DITNPI NLRDGEPLDLSNNFGRLFVVKPD	412
Query	421	KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGR	480
		KKNPQLQDLDMMLTTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGR	
Sbjct	413	KKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGR	472
Query	481	E---EEEDEDEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAEN	537
		E EEE+EDEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAEN	
Sbjct	473	EQEWEEEEEDEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFIMPAAHPVAINASSELHLLGFGINAEN	532
Query	538	NHRI FLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQKESHFVSA	585
		NHRI FLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQ+ESHFVSA	
Sbjct	533	NHRI FLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQRESHFVSA	580

Figure N° 41: Alignements des séquences en acides aminés de l'isoforme P41B de l'Ara h1 et la conarachine monomère de l'Ara h1

Query : Isoforme P41B, **Sbjct** : Conarachine

Tableau N° 11: Peptides distinctifs mis en évidence de l'isoforme P41B et de la conarachine par rapport à l'isoforme P17

Peptides distinctifs des isoformes P41B et P17 de l'Ara h1		Peptides distinctifs du l'isoforme P17 et la conarachine		Peptides communs à la conarachine et l'isoforme P41B
Peptides caractéristiques de l'iso forme P17	Peptides caractéristiques de l'iso forme P41B	Peptides caractéristiques de l'iso forme P17	Peptides caractéristiques de la conarachine	
EGEQEWGTPGSE.....(Fm)	EGEQEWGTPGSH.....(Fa)	IVQIEAR.....(Fn)	SSDNEGVIK.....(Fs)	EREEDWR.....(Ff)
IVQIEAR.....(Fn)	IVQIEAK.....(Fb)	GOR.....(Fr)	WGPAEPRE.....(Ft)	HDNQNLVAK.....(Fg)
EHVQELTK.....(Fo)	EHVEELTK.....(Fc)	PNTLVLPK.....(Fl)	EREEDWR.....(Ff)	LFEVKPDKK.....(Fi)
DGEPDLSNNFGR.....(Fp)	EGEPDLSNNFGK.....(Fd)		YGNQNGR.....(Fu)	EQQQR.....(Fk)
EEDEEEEGSNR.....(Fq)	DEDEEEEGSNR.....(Fe)		HDNQNLVAK.....(Fg)	
GOR.....(Fr)	EREEDWR.....(Ff)		LFEVKPDKK.....(Fi)	
	HDNQNLVAK.....(Fg)		EQQQR.....(Fk)	
	SSENEGVIK.....(Fh)		HAK.....(Fv)	
	LFEVKPDKK.....(Fi)		QAK.....(Fw)	
	EVR.....(Fj)			
	EQQRGR.....(Fk)			

Tableau N° 12: Peptides identifiés dans les bandes immunoréactives de l'isoforme P41B et de la conarachine

Protéines	Isoforme P41B			Conarachine	
	1	2	3	4	5
Séquences en acides aminés des peptides identifiés	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) IVQIEAK.....(Fb) EHVEELTK.....(Fc) EGEPDLSNFGK.....(Fd) DEDEEEGSR.....(Fe) EREEDWR.....(Ff) SSENNEGIVK.....(Fh) LFEVKPDKK.....(Fi)	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) IVQIEAK.....(Fb) EHVEELTK.....(Fc) EREEDWR.....(Ff) SSENNEGIVK.....(Fh) LFEVKPDKK.....(Fi)	EGEQEWGTPGSH....(Fa) IVQIEAK.....(Fb) EHVEELTK.....(Fc) EGEPDLSNFGK....(Fd) DEDEEEGSR.....(Fe) EREEDWR.....(Ff) SSENNEGIVK.....(Fh) LFEVKPDKK.....(Fi)	SSDNEGIVK.....(Fs) EREEDWR.....(Ff) LFEVKPDKK.....(Fi)	SSDNEGIVK.....(Fs) LFEVKPDKK.....(Fi)
Séquences en acides aminés des peptides communes identifiés	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) ; IVQIEAK.....(Fb) EHVEELTK.....(Fc) ; SSENNEGIVK.....(Fh) EREEDWR.....(Ff) ; LFEVKPDKK.....(Fi)			SSDNEGIVK.....(Fs) LFEVKPDKK.....(Fi)	

les épitopes de l'Ara h1 NNFG**K**LFEVK et NEG**VIVKSKEHVEELTKHAKSVSK** appartiennent à l'isoforme P41B. Les arguments fournis pour Fi= LFEVK**PDKK** et Fh= S**SEN**NEG**VIVK** prouvent que Fs= SSDNEG**VIVK** est un épitope spécifique de la conarachine. Ff= E**REEDWR** de l'isoforme P41B et de la conarachine est généré après hydrolyse par la trypsine des liaisons peptidiques dans lesquelles les arginines de R**EREEDWRQP** fournissent leurs fonctions carboxyles. Il est déduit que l'épitope de l'Ara h1 R**EREEDWRQP** est de l'isoforme P41B et de la conarachine. En général, l'Ara h1 possède 23 épitopes (**Burks et al., 1997**). Les séquences des épitopes linéaires de l'allergène Ara h1 cités par la littérature sont données dans le tableau N° 13. L'isoforme P41B (Ara h1) et la conarachine (Ara h1) reconnues par les IgEs ainsi que la glycinine (Ara h3) et la conglutine (Ara h6) classées allergènes mais n'induisent pas de sensibilisations allergiques dans ce cas sont stables à la chaleur comme la plupart des allergènes alimentaires (**Mittag et al., 2004 ; Roth-Walter et al., 2014**). Leur solubilisation après le grillage de l'arachide à 140 °C pendant 40 min et leur mise en évidence par électrophorèse prouve la conservation de leur structure tridimensionnelle estimée par certains auteurs (**Kulkarni et al., 2013 ; Li et al., 2014**) comme fondamentale pour l'évaluation d'une réactivité IgE potentielle. Dans le tableau N° 14 sont donnés les peptides stables au traitement effectué. La présence de Fi= LFEVK**PDKK**, Fd= E**GEPDLSNNFGK**, Fh= S**SEN**NEG**VIVK**, Fc= E**HVEELTK** et Ff= E**REEDWR** de l'isoforme P41B et Fs= SSDNEG**VIVK** de la conarachine est la preuve que le grillage n'a pas entraîné la dégradation des épitopes NNFG**K**LFEVK, NEG**VIVKSKEHVEELTKHAKSVSK**, R**EREEDWRQP** et SSDNEG**VIVK**. Cette opération thermique peut ne pas avoir d'effet sur l'allergénicité de ces macromolécules. **Maleki et al., 2000**, ont trouvé que la capacité de liaisons aux IgE spécifiques des protéines d'arachide grillée est approximativement 90 fois plus importante que celle d'arachide crue. Pour **Mondoulet, 2003**, il n'existe pas de différences significatives. Ces études prouvent la résistance des protéines d'arachide et la forte stabilité de l'Ara h2. Par rapport à l'arachide étudiée, le score protéique très faible obtenu pour l'Ara h2 peut expliquer la sensibilité de cet allergène vis-à-vis du grillage.

Tableau N° 13: Séquences en acides aminés des épitopes linéaires connus de l'allergène Ara h1 d'arachide (Shin et al., 1998 ; Zhou et al., 2013)

Numéros	Séquences en acides aminés	Positions
1	AKSSPYQKKT	25-34
2	QEPDDLKQKA	48-57
3	LEYDPRLVYD	65-74
4	GERTRGRQPG	89-98
5	PGDYDDRRQ	97-106
6	PRREEGGRWG	107-116
7	REREEDWRQP	123-132
8	EDWRRPSHQQ	134-143
9	QPRKIRPEGR	143-152
10	TPGQFEDFFP	294-303
11	SYLQEFRSNT	311-320
12	FNAEFNEIRR	325-334
13	EQEERGQRRW	344-353
14	NEGVIVKSKEHVEELTKHAKSVSK	361-385
15	DITNPINLRE	393-402
16	NNFGKLFEVK	409-418
17	GNLELV	463-468
18	RRYTARLKEG	498-507
19	ELHLLGFGIN	525-534
20	HRIFLAGDKD	539-548
21	IDQIEKQAKD	551-560
22	KDLAFPGSGE	559-568
23	KESHFVSARP	578-587

Tableau N° 14: Peptides identifiés de l'isoforme P41B et de la conarachine dans les bandes immunoréactives mises en évidence après grillage de l'arachide à 140°C pendant 40 min

Protéines	Isoforme P41B			Conarachine	
	1	4	9	3	11
Séquences peptidiques identifiées	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) IVQIEAK.....(Fb) EHVEELTK.....(Fc) EGEPDLSNFGK.....(Fd) SSENEGVIK.....(Fh) LFEVKPDKK.....(Fi) EREEDWR.....(Ff)	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) IVQIEAK.....(Fb) EHVEELTK.....(Fc) EGEPDLSNFGK.....(Fd) SSENEGVIK.....(Fh) LFEVKPDKK.....(Fi)	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) IVQIEAK.....(Fb) EGEPDLSNFGK.....(Fd) LFEVKPDKK.....(Fi)	SSDNEGVIK.....(Fs)	SSDNEGVIK.....(Fs)
Séquences peptidiques communes identifiées	EGEQEWGTPGSH.....(Fa) ; IVQIEAK.....(Fb) EGEPDLSNFGK.....(Fd) ; LFEVKPDKK.....(Fi)			SSDNEGVIK.....(Fs)	

III-7- Purification des protéines hydrosolubles d'arachide crue par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75

La figure N° 42 montre les chromatogrammes des macromolécules extraites à l'eau distillée purifiées. Il est observé deux pics correspondant à deux fractions désignées par F1 et F2 éluées dans les volumes 32-58 ml et 92-132 ml respectivement. En ce qui concerne la fraction F2, la masse moléculaire est d'environ 25 KDa. **Porterfield et al., 2009 et Kulis et al., 2012**, ont montré que la fraction contenant l'Ara h2 et l'Ara h6 purifiée par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75 a une Mr variant de 13 à 25 KDa. La fraction F2 correspond aux albumines 2S pures. La fraction F1 éluée représente les substances solubilisées dans les mêmes conditions que les albumines 2S. Il peut s'agir de l'isoforme P41B, l'isoforme P17 et la conarachine, l'Ara h3/Ara h4, la Gly1, la glycine, la storage protein et l'arachin ahy-3OS déterminées par l'analyse protéomique.

Au vu de l'intérêt de ce type de macromolécules dans l'étude de la relation structure-fonction, les propriétés allergéniques et les réactions croisées (**Moreno et al., 2004 ; Garino et al., 2010**), les protéines composant cette fraction sont fractionnées.

III-8- Fractionnement des protéines d'albumines 2S purifiées par chromatographie sur résine échangeuse d'anions sur gel de DEAE-Cellulose

Les protéines d'albumines 2S purifiées par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75 sont fractionnées par chromatographie échangeuse d'anions. La colonne utilisée est de type DEAE-Cellulose, le débit est de 2 ml/ 4min et le gradient de NaCl est de 0 à 0,4 M. La lecture des absorbances des éluats est à 280 nm. Les chromatogrammes représentés dans la figure N° 43 sont bien distincts. Il s'agit des deux isoformes d'albumines l'Ara h2 et l'Ara h6. Ces deux entités sont collectées et conservés à - 20°C. L'Ara h2 et l'Ara h6 sont les deux allergènes appartenant à la famille des albumines 2S (**Guillon et al., 2011 ; Bublin et al., 2013 ; Maleki et al., 2003 ; Klemans et al., 2013 ; Luo et al., 2013 ; Barre et al., 2005 ; Kim et al., 2013 ; Shreffler et al., 2005**). La purification de ces deux isoformes a fait l'objet de multiples travaux. Burks et al., 1992, ont isolé l'allergène Ara h2 par chromatographie sur résine échangeuse d'anions. La phase solide est une PL-SAX (BioRad). L'élué

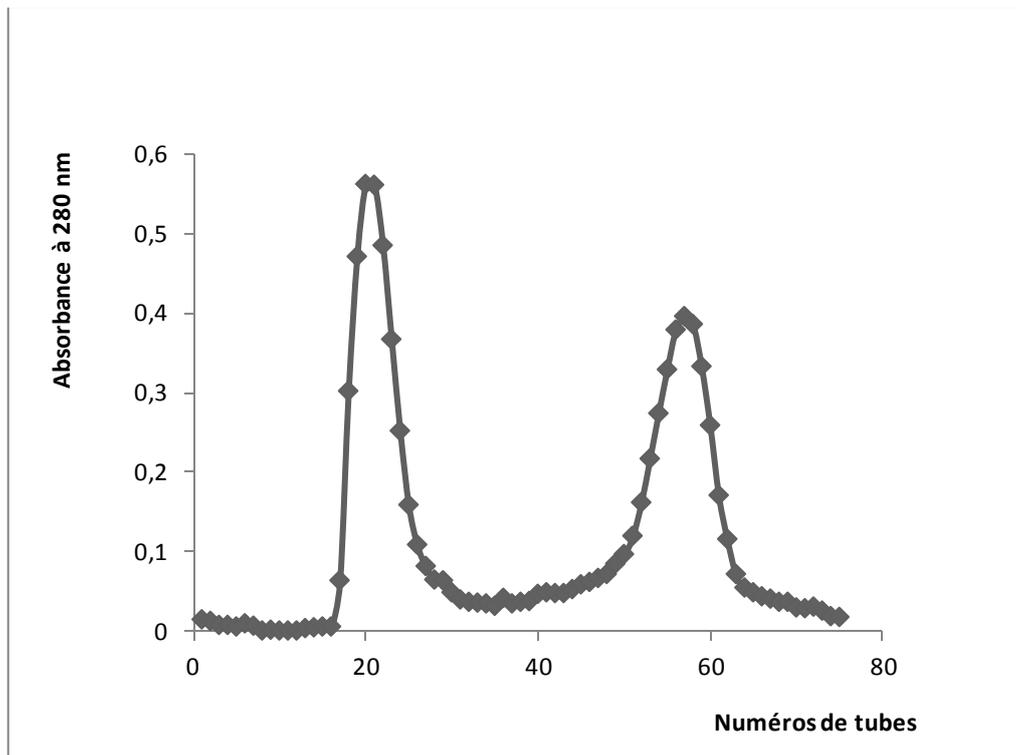


Figure № 42: Profil d'éluion de l'extrait de protéines hydrosolubles de la farine délipidée d'arachide crue obtenu par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G-75

- **Colonne** : hauteur (cm), diamètre (cm)- (h/d)= 120/1,5
- **Eluant** : Eau distillée
- **Débit** : 2ml/tube/4min

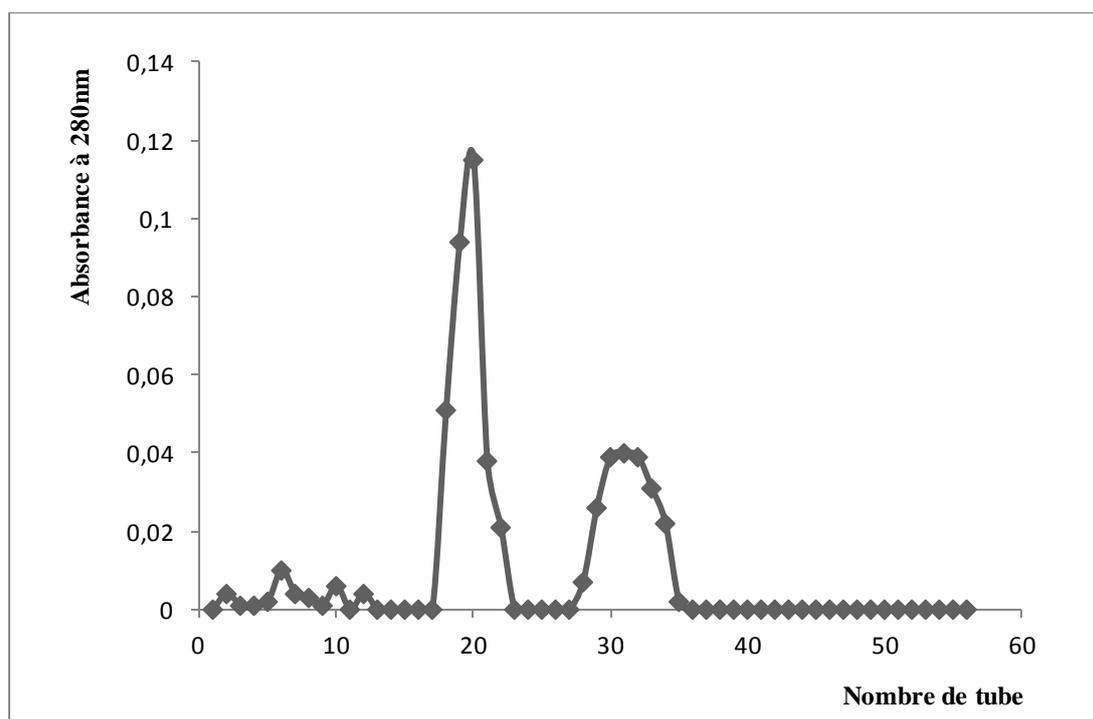


Figure N° 43 : Fractionnement des isoformes d'albumines 2S de l'arachide crue par chromatographie sur résine échangeuse d'anion DEAE-Cellulose

- **Absorbance** : à 280 nm
- **Débit** : 2ml/4min
- **Elution** : avec gradient de NaCl (0- 0,4 M)

Résultats et discussion

est réalisée avec un gradient de NaCl 0 à 1,5 M. **Sen et al., 2002**, purifient l'Ara h2 contenu dans un extrait protéique précipité au sulfate d'ammonium 40% à 70% et le fractionnent par chromatographie d'échange d'anions sur phase HighQ (BioRad). L'éluion est réalisée avec un gradient linéaire 40-140 mM de NaCl. L'Ara h6 est aussi purifié et fractionné par **Suhr et al., 2004** et **Koppelman et al., 2005**. La purification de ces protéines est importante pour l'étude des liaisons avec les IgEs et les activités biologiques (**Vissers et al., 2011**). Les extraits purs peuvent être utilisés dans les réactions immunologiques pour démontrer que la protéolyse élimine l'allergénicité des fragments hydrosolubles d'Ara h2. La technique de fractionnement utilisée ne permet pas d'obtenir l'isoforme P41B (Ara h1) et la conarachine monomère de l'Ara h1. Il est nécessaire d'employer d'autres techniques d'isolement de ces composés allergiques afin de les utiliser pour catégoriser les patients et apporter une aide pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique.

Conclusion

Conclusion

La graine d'arachide contient de nombreuses protéines dont certaines sont capables de provoquer des réactions immunologiques indésirables chez les individus atopiques. Les teneurs en protéines totales, insolubles et solubles dans l'eau distillée de cette denrée sont 45,49 %, 36,65 % et 9,99 % respectivement. L'évaluation de l'hétérogénéité des protéines hydrosolubles a permis de déterminer l'Ara h1, l'Ara h2, l'Ara h3 et l'Ara h6. Les isoformes P41B et P17 et la conarachine sont identifiés pour l'Ara h1. L'Ara h3/Ara h4, la storage protéine, la Gly 1, la glycinine et l'arachine Ahy-3 OS correspondent à l'Ara h3. La conglutine-7 et la conglutine désignent successivement l'Ara h2 et l'Ara h6. Ces entités protéiques sont caractérisées par des Mr faibles de 16.9 à 71.3 kDa et des pHi acides ou neutres. Il est généré des fragments protéiques de globulines 7S et 11S solubles dans l'eau résultant de la protéolyse naturelle à l'intérieur de la graine. L'isoforme P41B et la conarachine sont résistants au grillage à 140°C pendant 40 min. Contrairement à la glycinine (Ara h3) et à la conglutine (Ara h6), l'isoforme P17 et la conglutine-7 (Ara h2) sont sensibles au traitement thermique appliqué. L'isoforme P41B et la conarachine sont sources d'allergie. Le résultat pour l'Ara h2 ne suit pas la réponse IgEs=31.20 Ku/l établi par dosage immuno-enzymatique. Les peptides solubilisés provenant de la protéolyse naturelle de la molécule ne renferment pas les épitopes permettant la liaison IgEs-Ara h2. Il est démontré que les séquences peptidiques NNFGLFEVK et NEGVIVKSKEHVEELTKHAKSVSK, SSDNEGVIVK et REREEDWRQP sont consécutivement les épitopes de l'isoforme P41B, de la conarachine et de l'isoforme P41B et la conarachine. Ces variants antigéniques ne sont pas dégradés par le grillage de l'arachide à 140°C pendant 40 min. Ce processus n'a pas d'effet sur l'allergénicité de l'isoforme P41B et la conarachine. Les techniques de purification et de fractionnement exploitées peuvent être employées dans les études sur la réduction ou l'élimination de l'allergénicité par protéolyse naturelle ou l'obtention de composés allergéniques albumines 2S. Ces derniers peuvent servir pour les réactions immunologiques dans le but de catégoriser les patients et donc apporter une aide pour le diagnostic et la prise en charge thérapeutique. Pour les composés appartenant aux globulines 7S et 11S, il est nécessaire de les récupérer avec des méthodes ne permettant pas leur dénaturation irréversible et de les éluer avec une solution appropriée.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

A.O.A.C ., Official Methods of Analysis. 4^{ème} éd. Association of Official Analytical Chemists 1984: 152-164.

Aalberse, R C. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 228-238.

Afify, A E M., Ashed, M M R., Mahmoud, I A., El-Beltagi, H S. Effect of Gamma Radiation on Protein Profile, Protein Fraction and Solubility's of Three Oil Seeds: Soybean, Peanut and Sesame. *Not Bot Horti Agrobi* 2011 : 39(2):90-98.

Agne, P S E., Rancé, F., Bidat, E. Allergie au sésame. *Rev fr allergol immunol clin* 2003; 43: 507–516.

ALINORM 03/34: FAO/WHO Food Standard Programme. 30 Juin-5 Juillet 2003. C. A. C.: Appendice III: Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants; et Appendix IV: Annex on the assessment of possible allergenicity. Rome, Italy: Codex Alimentarius Commission, 2003, 47-60.

Alvarez-Alvarez, J., Guillamón, E., Crespo, JF., Cuadrado, C., Burbano, C., Rodríguez, J., Fernández, C., Muzquiz, M. Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *J Agric Food Chem* 2005; 53(4):1294-1298.

Astwood, J D., Leach, J N., Fuchs, R L. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1269-1273.

B

Bach, J F., Chatenoud, L. Immunologie. Paris : Flammarion ; 2002.

Barre, A., Borges, J P., Culerrier, R., Rougé, P. Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes. *Immunol Lett* 2005; 100: 153–158.

Références bibliographiques

Béraud, J. Le technicien d'analyses biologiques. Londres-Paris-New York : Lavoisier ; 2001

Bernhisel-Broadbent, J., Sampson, H. Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83:435-440.

Beyer, K., Bardina, L., Grishina, G., Sampson, H A. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol*; 2002; 110: 154–159.

Beyer, K., Morrow, E., Li, X M., Bardina, L., Bannon, G A., Burks, A W et al. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 2001 ; 107:1077–1081.

Blanc, F. Développement d'un modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique : applications a l'étude des allergènes du lait et de l'arachide, et évaluation de l'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité de Ara h 1 [Thèse]. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) ; 2006.

Blank, U., Jouvin, M H., Guerin-Marchand, C., Kinet, J P. The high-affinity IgE receptor: lessons from structural analysis Le recepteur de forte affinite pour l'IgE: lecons d'une analyse structurale. *Med Sci. Paris* 2003 ; 19:63-69.

Blank, U., Rivera, J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends in Immunol* 2004 ; 25: 266-273.

Bouakkadia, H., Boutebba, A., Haddad, I., Vinh, J., Guilloux, L., Sutra, J P., Sénéchal, H., Poncet, P. Analyse immunoprotéomique des allergènes non-hydrosolubles de farines de quatre légumineuses : arachide, soja, sésame et lentille. *Ann Biol Clin* 2015; 73 (6): 690-704.

Branger, A., Richer, M M., Roustel, S. Alimentation et processus technologique. Paris : Dijon; 2007.

Breiteneder, H., Mills, E N. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005 ; 115 :14–23.

Breiteneder, H., Radauer, C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004 ; 113 : 821-830.

Brusic, V., Millot, M., Petrovsky, N. Allergen databases. *Allergy* 2003: 1093-1100.

Bublin, M., Kostadinova, M., Radauer, C., Hafner, C., Szepfalusi, Z., Varga, E M., et al. IgE cross-reactivity between the major peanut allergen Ara h2 and the non homologous allergens Ara h1 and Ara h3. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132 (1):118–124.

Burks, A M., Williams, L W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T J., Helm, R M. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *J. Allergy Clin. Immunol* 1992; 90:962–969.

Burks, A W., Shin, D., Cockrell, G., Stanley, J S., Helm, R M., Bannon, G A. Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *Eur J Biochem* 1997; 245: 334-339.

Byun, M W., Kim, J H., Lee, J W., Park, J W., Hong, C S., Kang, I J. Effects of gamma radiation on the conformational and antigenic properties of a heat-stable major allergen in brown shrimp. *J Food Prot* 2000; 63(7): 940-944.

C

Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N. *Immunologie clinique : De la théorie à la pratique, avec cas cliniques.* Paris : De Boeck; 2004.

Chassaigne, H., Trégoat, V., Nørgaard, J V., Maleki, S J., van Hengel, A J. Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two dimensional differential gel electrophoresis, Western blotting and Q-TOF mass spectrometry. *J of proteomics* 2009; 72: 511–526.

Chum, V. *Préparations allergologiques pour intradermoréaction au CHU de Nancy: Détermination du coût direct lié à la fabrication par la pharmacie à usage intérieur [Thèse].* Nancy : Université de Lorraine ; 2015.

Références bibliographiques

Chung, S., Champagne, E T. Effect of enzyme treatment on the allergenic properties of peanuts. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2): S247.

CICBAA. Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA). <http://www.cicbaa.com>. 2005.

Cooke, S K., Sampson, H A. Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol* 1997 ; 159 :2026-2032.

Cucu, T., De Meulenaer, B., Devreese, B. MALDI based identification of soybean protein markers – Possible analytical targets for allergen detection in processed foods. *Peptides* 2012, 33, 187–196.

D

Davis, P J., Smales, C M., James, D C. How can thermal processing modify the antigenicity of proteins?. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 56 (s67): 56-60.

Davis, P J., Williams, S C. Protein modification by thermal processing. *Allergy* 1998; 53: 102-105.

De Franco., Robertson., Locksley. *Immunité : La réponse immunitaire dans les maladies infectieuses et inflammatoires.* Paris : De Boeck ; 2009.

de Leon, M P., Rolland, J M., O’Hehir, R E. The peanut allergy epidemic: allergen molecular characterization and prospects for specific therapy. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9: 1-18.

Duan, X H., Jiang, R., Wen, Y J., Bin, J H. Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. *Plant Physiol Biochem* 2013; 66: 84-90.

Dubuisson, C., La Vieille, S., Martin A. *Allergies alimentaires : Etat des lieux et propositions d’orientations.* Nutrition humaine. Paris (FR) : AFSSA ; 2002

Dutau, G., Rancé, F. Allergie à l’arachide. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2001; 41: 187-198.

F

Flinterman, A E., Pasmans, S G., Hoekstra, M O., Meijer, Y., van Hoffen, E., Knol, E F., Hefle, S L., Bruijnzeel-Koomen, C A., Knulst, A C. Determination of no-observed-adverse effect levels and eliciting doses in a representative group of peanut-sensitized children. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:448-454.

G

Garino, C., Zuidmeer, L., Marsh, J., Lovegrove, A., Morati, M., Versteeg, S., Schilte, P., et al. Isolation, cloning, and characterization of the 2S albumin: A new allergen from hazelnut. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 1257–1265.

Genetet, N. Immunologie. Paris : Lavoisier ; 2002.

Gérald, A. Profil des nourrissons atteints d'allergie aux protéines de lait de vache : Etude rétrospective cas-témoins à l'hôpital Jean Verdier (Bondy, 93) [Thèse]. Paris : Université Denis Diderot ; 2011.

Grundy, J., Matthews, S., Bateman, B., Dean, T., Arshad, S H. Rising prevalence of allergy to peanut in children: Data from 2 sequential cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 784-789.

Guillon et al., 2011 : Guillon, B., Hazebrouck, S., Adel-Patient, K., Paty, E., Scheinmann, P., Wal, J M., Bernard, H. Role Of Disulfide Bridges In The Proteolytic Susceptibility And Allergenicity Of Ara H 6, A Major Allergen From Peanut. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127 (2): AB236.

H

Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D G., Platts-Mills, T A E., Thomas, W. Allergen nomenclature .WHO 1994; 72 (5):796-806.

Høst, A., Andrae, S., Charki, N S et al. Les tests d'allergie chez l'enfant: pourquoi, qui, quand, et comment tester? *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2005 ; 45 (2) : 164–172.

J

Jacquet, S., Moneret-Vautrin, D A. Les allergènes de l'arachide et des fruits à coque .Rev fr Allergol Immunol Clin 2007; 47 : 487–491.

Jaffuel, D., Demoly, P., Bousquet, J. Les allergies alimentaires. Rev Fr Allergol Immunol Clin 2001; 41: 169-186

Jensen, O N. Modification-specific proteomics: characterization of posttranslational modifications by mass spectrometry. Curr Opin Chem Biol 2004 ; 8 (1) :33-41.

Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J F., Kasapis, S. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. Food Chem 2011; 129: 1513–1522.

Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J.F, Kasapis, S., Barrow, C J. Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. Food Chem 2012; 134: 1343–1353.

K

Kim, J., Lee, J Y., Han, Y., Ahn, K. Significance of Ara h 2 in clinical reactivity and effect of cooking methods on allergenicity. Ann Allergy Asthma Immunol 2013; 110: 34-38.

Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M., Becker, W M. Selective cloning of peanut allergens, including profiling and 2S albumins, by phage display technology. Int Arch Allergy Immunol 1999; 119 : 265-274.

Klemans, R J B., Otte, D., Knol, M., Knol, E F., Meijer, Y. The diagnostic value of specific IgE to Ara h 2 to predict peanut allergy in children is comparable to a validated and updated diagnostic prediction model. J Allergy Clin Immunol 2013;131:157-163.

Kobayashi, M., Hashimoto, Y., Taniuchi, S., Tanabe, S. Degradation of wheat allergen in Japanese soy sauce. Int J Mol Med 2004; 13(6): 821-827.

Références bibliographiques

Kobayashi, M., Matsushita, H., Yoshida, K., Tsukiyama, R., Sugimura, T., Yamamoto, K. In vitro and in vivo anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med*. 2004; 14(5): 879-884.

Koppelman, S J., Knol, E F., Vlooswijk, R A., Wensing, M., Knulst, A C., Hefle, S L., et al. Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy* 2003; 58(11):1144-1151.

Koppelman, S J., de Jong, G A., Laaper-Ertmann, M., Peeters, K A., Knulst, A C., Hefle, S L., Knol, E F. Purification and immunoglobulin E-binding properties of peanut allergen Ara h 6: evidence for cross-reactivity with Ara h 2. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 490-497.

Krause, S R., Eese, G., Randow, S., Zennaro, D., Quarantino, D., Palazzo, P., et al. Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:771–778.

Kulis, M., Chen, X., Lew, J., Wang, Q., Patel, O P., Zhuang, Y., Murray, K S et al. The 2S albumin allergens of *Arachis hypogaea*, Ara h 2 and Ara h 6, are the major elicitors of anaphylaxis and can effectively desensitize peanut-allergic mice. *Clin Exp Allergy* 2012 ; 42(2): 326–336.

Kulkarni, A., Ananthanarayan, L., Raman, K. Identification of putative and potential cross-reactive chickpea (*Cicer arietinum*) allergens through an silico approach. *Comput Biol Chem* 2013 ; 47 :149-155.

Kumar, S., Verma, A K., Das, M., Dwivedi, P D. Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *Inter Immunopharmacol* 2012; 13: 432-439.

L

Lachance, P., Cartier, A., Dolovich, J., Malo, J L. Occupational asthma from reactivity to an alkaline hydrolysis derivative of gluten. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81: 385-390.

Larsen, M R., Roepstorff, P. Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. *Fresenius J Anal Chem* 2000; 366 (6-7): 677-690.

Références bibliographiques

Leduc, V., Moneret-Vautrin, D A., Guerin, L., Morisset, M., Kanny, G. Anaphylaxis to wheat isolates: Immunochemical study of a case proved by means of double-blind, placebo-controlled food challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(4): 897-899.

Lee, J W., Kim, J H., Yook, H S., Kang, K O., Lee, S Y., Hwang, H J., Byun, M W. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *J Food Prot* 2001; 64 (2): 272-276.

Lee, J W., Lee, K Y., Yook, H S., Lee, S Y., Kim, H Y., Jo, C., Byun, M W. Allergenicity of hen's egg ovomucoid gamma irradiated and heated under different pH conditions. *J Food Prot* 2002; 65 (7): 1196-1199.

Lee, L A., Burks, W. Food Allergies: Prevalence, Molecular Characterization, and Treatment/Prevention Strategies. *Annu Rev Nutr* 2006; 26: 539-565.

Letonturier, P. Immunologie générale. Paris: Masson; 2001.

Li, X., Yang, H W., Chen, H., Wu, J., Liu, Y., Wei, J F. In Silico Prediction of T and B Cell Epitopes of Der f 25 in *Dermatophagoides farinae*. *Int J Genomics* 2014: 1-10.

Lifrani, A. Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires : Mise au point de modèle de souris allergiques à l'arachide, à l'albumine, à la caséine et à la colle de poisson [Thèse]. Paris : Institut National Agronomique Paris-Grignon; 2006.

Luo, C., Hu, C., Gao, J., Li, X., Wu, Z., Yang, A., Chen, H. A potential practical approach to reduce Ara h 6 allergenicity by gamma irradiation. *Food Chem* 2013; 136: 1141–1147.

M

Malandain, H. Allergènes protéiques: nomenclature et classification. Disponible sur URL : www.allerdata.com/spip.php.

Maleki, S J., Chung, S Y., Champagne, E T., Raufman, J P. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 106 :763–768.

Références bibliographiques

Maleki, S J., Viquez, O., Jacks, T., et al. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112 (1): 190–195.

Malley, A., Beacher, L., Mackler, D., Perlman F. The isolation of allergens from the green pea. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 56(4): 282-290.

Manfred et Moll. Précis des risques alimentaires. Londres-Paris-New York : Lavoisier ; 2000.

Mann, M., Jensen, O N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003; 21(3): 255-261.

Martin, A., La Vieille, S., Le Stunff, C. Allergies alimentaires : les plantes génétiquement modifiées ont-elles un impact [rapport]. Paris : Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments ; 2006.

Matthias, B. Determination of allergens in foods. *Trends in analytical chemistry* 2001; 11(20):662-672.

Mills, R D., Trewhella, J., Qiu, T W., Welte, T., Ryan, T M., Hanley, T., Knott, R B., Lithgow, T., Mulhern, T D. Domain organization of the monomeric form of the Tom70 mitochondrial import receptor. *J Mol Biol* 2009;388(5): 1043-1058.

Mittag, D., Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W M., et al. Ara h8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 1410-1417.

Mondoulet, L. Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs [Thèse]. Toulouse. Institut National Des Sciences Appliquées De Toulouse ; 2005.

Mondoulet, L., Drumare, M F., Paty, E., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Wal, J M., et al. Influence des procédés thermiques sur l'allergénicité de l'arachide. *Rev fr allergol Immunol Clin* 2003; 43: 486–491.

Références bibliographiques

Moneret-vautrin, D A. Evaluation de l'allergénicité des aliments : application au diagnostic de l'allergie alimentaire [Thèse]. Nancy: Université de HENRI POINCARÉ I ; 2008.

Moneret-Vautrin, D A. Les allergènes alimentaires et leurs modifications par les technologies agroalimentaires. Rev fr Allergol 1997 ; 37 (1) :21-28.

Moneret-Vautrin, D A., Kanny, G. Axes de recherche en allergologie alimentaire: hypoallergenicite et vaccins. Rev F Allergol Immunol Clin 2007; 47: 305-313.

Moreno, F J., Jenkins, J A., Mellon, F A., Rigby, N M., et al. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). Biochim Biophys Acta 2004; 1698:175–186.

Mujoo, R., Trinh, D T., Ng, P K W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. Food Chem 2003, 82, 265–273.

O

Oppenheimer, J., Nelson, H., Bock, S., et al. Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 256-262.

Osborne, T B, Campbell, G F. Proteins of lentils. J Amer Chem Society 1898; 20: 362.

P

Pan, W., Zhang, T., Takebe, M., Sampson, H. Comparison of Efficacy of a Novel Probiotic from Koji Fermentation (ImmuSoy) with LGG on Peanut Allergy. J allergy Immunol 2006; 117(2)-supl 1: S327

Parent-Massin, D. Exigences réglementaires ou comment prévenir la présence d'allergènes alimentaires. Congrès SFT 2005. Octobre.

Pastorello, E A., Varin, E., Farioli, V., Ortolani, C., Trambaioli, C., et al. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. J Chromatogr B. Biochem Sc App 2001 ; 756 :85–93.

Références bibliographiques

Patricia, F. Influence des procédés industriels sur l'allergénicité des aliments [Thèse]. Nancy : Université Henri Poincaré-Nancy I ; 2008.

Paupe, J., Scheinmann, P., De Blic, J. Allergologie pédiatrique. Paris ; 1994.

Peeters, K A., Koppelman, S J., van, H E., van der Tas, C W., den Hartog Jager, C F., Penninks, A H., Hefle, S L., Bruijnzeel-Koomen, C A., Knol, E F., Knulst, A C. Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy? Clin Exp Allergy 2007; 37:108-115.

Peltre, G. Identifying and eliminating allergens .J fr OLC 2002:112-114.

Penchev, P I. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions [Thèse]. Institut National Polytechnique (Toulouse); 2010.

Porterfield., Murray, K S., Schlichting, D G., Chen, X., Hansen, K C., Duncan, M W., Dreskin, S C. Activité effectrice des allergènes de l'arachide : un rôle essentiel pour Ara h 2, Ara h 6, et leurs variants. Clini Exper Allergy 2009; 39 (7): 1099 – 1108.

Q

Quevauvilliers, J., Fingerhut, A. Dictionnaire médicale. Paris : Masson ; 2001.

R

Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. J Allergy Clin Immunol 2008 ; 121 :847-852.

Rivas, N R., Dench, J E., Caygill, J C. Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum*L.) seed and the preparation of two protein isolates. J Science Food Agricultur 1981; 32: 565–571.

Roth-Walter, F., Gomez-Casado, C., Pacios, L F., Mothes-Luksch, N., Roth, G A., Singer, J., et al. Bet v 1 from birch pollen is a lipocalin-like protein acting as

allergen only when devoid of iron by promoting Th 2 lymphocytes. *J Biol Chem* 2014; 289: 223-229.

Rougé, P., Culerrier, R., Rancé, F., Barre, A. Quoi de neuf dans la description des allergènes de l'arachide et des fruits à coque ?. *Rev fr Allergol* 2009; 49: 230–234.

S

Sabbah, A. Allergologie et immunologie clinique. Paris : Lavoisier ; 1994.

Sanchez, C., Frémont, S. Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires. *Rev fr Allergol Immunol Clin* 2003 ; 43 : 13-20.

Sánchez-Monge, R., Pascual, C Y., Díaz-Perales, A., Jesús Fernández-Crespo, B S., Martín-Esteban, M., Salcedo, G. Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J Allergy Clin Immunol* 2000: 955-961.

Sathe, S K., Sharma, G M. Effects of food processing on food allergens. *Mol Nut Food Res* 2009; 53(8): 970–978.

Sell, M., Steinhart, H., Pasche, A. Influence of maturation on the alteration of allergenicity of green pea (*Pisum sativum* L.). *Journal Agric Food Chem* 2005; 53(5):1717-1722.

Sen, M., Kopper, R., Pons, L., Abraham, E D., Burks, A W., Bannon, G A. Protein structure plays a critical role in peanut allergen stability and may determine immunodominant IgE-binding epitopes. *J Immunol* 2002; 169:882–887.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protocols* 1.2007: 2856 – 2860.

Shin, D S., Compadre, C M., Maleki, S J., Kopper, R A., Sampson, H., Huang, S K, et al. Biochemical and structural analysis of the IgE binding sites on Ara h 1, an abundant and highly allergenic peanut protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 13753-13759.

Références bibliographiques

Shreffler, W G., Lencer, D A., Bardina, L., Sampson, H A. IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 893-899.

Sicherer, S H. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 127 (3): 594-602.

Sicherer, S H., Munoz-Furlong, A., Sampson, H A. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1203-1207.

Sicherer, S H., Muñoz-Furlong, A., Godbold, J H., Sampson, H A. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *The J Allergy Clin Immunol* 2010 ; 125(6) : 1322– 1326.

Sicherer, S H., Sampson, H A. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(2):291-307.

Singh, A., Munshi, S., Raghavan, V. Effect of external electric field stress on gliadin protein conformation. *Proteomes* 2013a; 1(2): 25–39.

Singh, A., Orsat, V., Raghavan, V. A comprehensive review on electrohydrodynamic drying and high-voltage electric field in the context of food and bioprocessing. *Drying Technology* 2012; 30(16):1812–1820.

Singh, A., Orsat, V., Raghavan, V. Soybean hydrophobic protein response to external electric field: A molecular modeling approach. *Biomolecules* 2013b ; 3(1) : 168–179.

Somkuti, J., Smeller, L. High pressure effects on allergen food proteins. *Biophys Chem* 2013; 183: 19–29.

Souci, S W. Food composition and nutrition table. Medpharm Scientific publications 1994. Ref Type: Journal (Full).

Suhr, M., Wicklein, D., Lepp, U., Becker, W M. Isolation and characterization of natural Ara h 6 : Evidence for a further peanut allergen with putative clinical relevance based on resistance to pepsin digestion and heat. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48:390-399.

T

Thomas, W R., Hales, B J., Smith, W A. Structural biology of allergens. *Curr allergy Asthma Rep* 2005 ; 5 :388-393.

Tombs, M P. An Electrophoretic Investigation of Groundnut Proteins: the Structure of Arachins A and B. *Biochem J* 1965; 96:119-133.

Traidl-Hoffmann, C., Jakob, T., Behrendt, H. Determinants of allergenicity .*J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 558-566.

Trendelenburg, V., Rohrbach, A., Schulz, G., Schwarz, V., Beyer, K. Molecular sIgE profile in infants and young children with peanut sensitization and eczema. *Allergo J Int* 2014; 23(5): 152–157.

U

Urbano, G., Porres, J M., Frias, J., Vidal-Valverde, C. Lentil: An ancient crop for modern times. Nutritional value. In S. S. Yadav, D. L. McNeil, & P. C. Stevenson (Eds.) 2007: 47– 93p.

V

Vereda, A., van, H M., Ahlstedt, S., Ibanez, M D., Cuesta-Herranz, J., van, O J., et al. Peanut allergy : Clinical and immunologic differences among patients from 3 different geographic regions. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127(3): 603-607.

Vissers, Y M., Blan , F., Skov, P S., Johnson, P E., Rigby, N M., Przybylski-Nicaise, L., et al. Effect of Heating and Glycation on the Allergenicity of 2S Albumins (Ara h 2/6) from Peanut. *Plos One* 2011; 6(8): e23998.

Vuitton, D A. Allergic cross-reactions: General and practical aspects. *Clin Rev Allergy Immunol* 1997; 15(4): 367-374.

W

Wichers, H J., De Beijer, T., Savelkoul, H F., Van Amerongen, A. The major peanut allergen Ara h 1 and its cleaved-off N-terminal peptide; possible implications for peanut allergen detection. *J Agric Food Chem* 2004 ; 52(15) :4903-4907.

Wilson, S., Blaschek, K., de Mejia, E G. Allergenic proteins in soybean: Processing and reducing of P34 allergenicity . *Nut Reviews* 2005; 63: 47–58.

Wolff, N., Cogan, U., Admon, A., Dalal, I., Katz, Y., Hodos, N., et al. Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 1165–1174.

Z

Zhou, Y., Wang, J., Yang, X., Lin, D., Gao, Y., Su, Y., Yang, S., et al. Peanut Allergy, Allergen Composition, and Methods of Reducing Allergenicity: A Review. *Inter J Food Science* 2013.