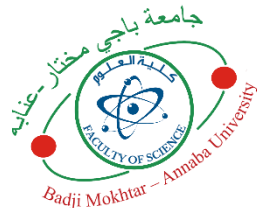


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT

Spécialité : Biochimie

THEME

**Etude immunoprotéomique, biochimique et
technologique de l'haricot niébé (*Vigna unguiculata L.*
Walp)**

Présentée par : Mr CHENTOUH Mouhamed Mounir



Directeur de thèse : Professeur Boutebba Aissa

Université Badji Mokhtar Annaba

Membres de Jury:

Président : Professeur Boumendjel Mahieddine	Université Badji Mokhtar Annaba
Examinatrice : Professeur Souiki Linda	Université de Guelma
Examinatrice : Professeur Benbouzid Houneida	Université Badji Mokhtar Annaba

Année universitaire 2023-2024

C'est avec grande gratitude et modestie que je dédie ce travail à mes chers parents qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite, que DIEU leur accorde bonheur et longue vie, Insh'Allah. À mes sœurs, qui ont toujours été là pour moi tout au long de mon cursus universitaire, à mes amis proches, mes collègues et mes enseignants."

Remerciements

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

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame Christiane Hilger et à Madame Stéphanie Kler pour l'accueil au sein de leur équipe durant mon stage à l'Institut de Santé du Luxembourg, pour m'avoir assisté avec intérêt durant la réalisation de mes travaux et pour la confiance dont elles ont fait preuve à mon égard.

Je remercie sincèrement Monsieur Salama Mohamed, directeur de l'entreprise de fabrication de produits sans gluten « Miny », de m'avoir permis de produire les farines au sein de son entreprise.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Monsieur le professeur Boumendjel Mahieddine pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier aussi les membres du jury, les professeurs Madame Souiki Linda et Madame Benbouzid Houneida, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation ainsi qu'aux membres du laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée du département de Biochimie de l'Université de Badji Mokhtar Annaba.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Le but de ce travail est l'étude immuno-protéomique, biochimique et technologique du haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp.* L'immuno-protéomique révèle la présence de quatre allergènes jusqu'à la non identifiés dans le haricot niébé : la viciline, la β conglycinine (sous unité A et B) et l'albumine 2S, ainsi que des réactions croisées entre le haricot niébé, l'arachide et les pois verts. La caractérisation biochimique indique que le haricot niébé est une excellente source de nutriments et un précieux complément de céréales. La caractérisation technologique montre que la farine d'haricot niébé influe positivement sur la texture, la saveur et la qualité des produits sans gluten, lorsqu'elle est incorporée à des ratios inférieurs à 15%. Le diagramme technologique mis au point permet d'isoler la farine du haricot niébé des divers produits de mouture. La farine obtenue se caractérise par l'absence de prolamine et de gluténine qui constituent les principaux composants du gluten. Ces protéines absorbent plus d'eau que les albumines et les globulines et sont responsables de la force boulangère des farines mais, sont à proscrire dans la diète des personnes souffrantes de la maladie cœliaque. Les deux formulations de farine obtenues (F1 : ratio céréales/ haricot niébé 2 :1 et F2 : ratio céréales/ haricot niébé 10 :1) composées d'un mélange farine de riz, maïs, fécule de pomme de terre et amidon de maïs sont d'excellentes sources de macronutriments, micronutriments et oligo-éléments pour les personnes qui suivent des diètes. La panification de la farine F2 conduit à l'obtention d'une pâte assez consistante. Le pain fabriqué a une croûte craquante, peu épaisse et cassante, une mie friable molle et un goût agréable et savoureux.

Mots clés : Immuno-protéomique, protéines allergènes, réactivités croisées, haricot niébé, nutriments, farines.

Abstract

The purpose of this work is to study the immuno-proteomic, biochemical, and technological characteristics of cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*). Four allergens were identified in cowpea: vicilin, B Conglycinin (α and β subunits), and the 2S albumin. IgE cross-reactivity between cowpea, peanut, and green pea was highlighted. The biochemical characterization indicates that cowpea is an excellent source of nutrients and a valuable complement to cereals. Technological characterization shows that cowpea flour positively affects the texture, flavor, and quality of gluten-free products when incorporated at ratios lower than 15%. The developed technological diagram allows the isolation of cowpea flour from various milling products. The obtained flour is characterized by the absence of prolamins and glutelins, which are the main components of gluten. These proteins absorb more water than albumins and globulins and are responsible of the baking strength of flours but have to be avoided in the diet of people suffering from celiac disease. The two obtained flour formulations (F1: cereal/cowpea ratio 2:1 and F2: cereal/cowpea ratio 10:1), composed of a mixture of rice flour, maize, potato starch, and maize starch, are an excellent sources of macronutrients, micronutrients, and oligo elements for individuals following diets. The baking of flour F2 results in a consistent dough. The bread has a crispy crust, thin and brittle, a soft crumbly interior, and a pleasant, savory flavor.

Keywords: cowpea bean, immune-proteomics, allergenic proteins, nutrients, gluten-free flour.

ملخص

هدف هذا العمل هو دراسة البروتينية والكيميائية والتكنولوجية للفاصولياء السوداء *Vigna unguiculata L. Walp.* الدراسة البروتينية تكشف عن وجود أربعة مسببات للحساسية حتى الآن غير محددة في الفاصولياء السوداء: فيسيلين، بيتا كونجلايسين وحدة α و β ، والألومين S2، بالإضافة إلى التفاعل المتقاطع بين الفاصولياء السوداء وفول السودان والبازلء الخضراء. تشير التوصيفات الكيميائية إلى أن الفاصولياء السوداء هي مصدر ممتاز للعناصر الغذائية ومكمل قيم للحبوب. يُظهر التوصيف التكنولوجي أن دقيق الفاصولياء السوداء يؤثر إيجابيًا على نسيج وطعم وجودة المنتجات الخالية من الجلوتين عندما يتم إضافته بنسبة تقل عن 15%. يسمح الرسم التكنولوجي الذي تم تطويره بعزل دقيق الفاصولياء السوداء من مختلف منتجات الطحن. يتميز الدقيق المستخلص بغياب البرولامين والجلوتينين التي تشكل المكونات الرئيسية للجلوتين. تمتص هذه البروتينات مزيدًا من الماء وتعتبر مسؤولة عن قوة العجين ولكن يجب تجنبها في نظام غذائي للأشخاص الذين يعانون من داء السيلياك. الصيغتان للدقيق المستخلص: F1 نسبة الحبوب / الفاصولياء السوداء 2:1 و F2 نسبة الحبوب / الفاصولياء السوداء 10:1 التي تتكون من خليط من دقيق الأرز والذرة ونشاء البطاطا ونشاء الذرة هي مصادر ممتازة للعناصر الغذائية الأساسية والمغذيات الدقيقة والعناصر النزرة للأشخاص الذين يتبعون حميات غذائية. تؤدي عملية إعداد الخبز باستخدام دقيق F2 إلى الحصول على عجينة متماسكة بما فيه الكفاية. يتميز الخبز المصنوع بقشرة مقرمشة، ليست سميكة وهشة، ونسيج داخلي ليس صلبًا.

الكلمات المفتاحية: البروتين، البروتينات المسببة للحساسية، التفاعلات المتقاطعة، الفاصولياء السوداء، العناصر الغذائية، الدقائق.

Table des matières

Résumé	4
Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Introduction	16
CHAPITRE I : LES ALLERGIES AUX LEGUMINEUSES ALIMENTAIRES	1
I.1. Prévalence des allergies aux légumineuses alimentaires dans le monde	1
I.2. Prévalence des allergies alimentaires en Algérie	2
I.3. Mécanismes de développement des allergies alimentaires	2
I.4. Méthodes de diagnostic des allergies alimentaires	3
I.4.1 Test cutané et dosage des IgE	3
I.4.2. Test de provocation oral	4
CHAPITRE II : LES PROTÉINES ALLERGÈNES	4
II.1. Les Caractéristiques des protéines allergènes	4
II.2. Classification des protéines allergènes des légumineuses alimentaires	5
II.2.1. Superfamille des prolamines	3
II.2.2. Superfamille des Cupines	4
II.2.3. Superfamille des protéines liées à la pathogenèse (PR protéines)	5
II.2.4. Superfamille des Profilines	5
II.3. Les protéines allergènes de certaines légumineuses alimentaires	6
II.3.1. Les protéines allergènes de l'arachide	6
II.3.2. Les protéines allergènes de lentille	9
II.3.3. Les protéines allergènes du pois vert	9
II.3.4. Les protéines allergènes du lupin	10
II.3.5. Les protéines allergènes du soja	10
II.4. La réactivité croisée des allergènes d'origine alimentaire	11
II.4.1. Définition	11
II.4.2. Les réactivités croisées des légumineuses alimentaires	12
CHAPITRE III : LE HARICOT NIEBE (<i>Vigna unguiculata L. Walp</i>)	16
III.1. Généralité et origine	16
III.2 Taxonomie	18
III.3. Production à l'échelle mondiale et importance économique	18
III.4. Les composés nutritifs	19

III.4.1. Glucides et Fibres	19
III.4.2. Protéines et acides aminés essentiels.....	20
III.4.3. Lipides et Acides gras	21
III.4.4. Minéraux	21
III.4.5. Vitamines.....	21
III.5. Les composés anti-nutritifs	21
III.5.1. Les oligosaccharides.....	21
III.5.2. Acide Phytique	22
III.5.3. Polyphénols	22
III.5.4. Inhibiteurs de protéases et lectines	22
III.5.5. Les allergènes	23
III.6. Aptitudes physico-chimiques à la panification et valorisation de la farine du haricot niébé	23
CHAPITRE IV : MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
IV.1. Matériels biologiques	26
IV.2. Identification des protéines allergènes du haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	26
IV.2.1 Extraction des protéines du haricot niébé.....	26
IV.2.2. Électrophorèse monodimensionnelle et immunotransfert	27
IV.2.3. Électrophorèse bidimensionnelle et immunotransfert	28
IV.2.4. Analyse des protéines allergènes par spectrométrie de masse	30
IV.2.5. Recherche des protéines allergènes dans les bases de données.....	31
IV.2.6 Détermination des réactivités croisées entre le haricot niébé et le pois vert et entre le haricot niébé et l'arachide	31
IV.2.7. Évaluation de la réactivité des patients vis-à-vis des allergènes par le test d'activation des basophiles	33
IV.3. Détermination de la composition biochimique du haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	34
IV.3.1. Détermination de la teneur en amidon total	34
IV.3.2. Détermination de la teneur en cellulose brute	34
IV.3.3. Détermination de la teneur en lignine totale	35
IV.3.4. Détermination de la teneur en protéines.....	36
IV.3.5. Fractionnement sélectif des protéines	37
IV.3.6. Détermination de la teneur en lipides totaux.....	38
IV.3.7. Détermination de la composition en cendres, en microéléments et en oligo-éléments.....	38
IV.4. Détermination des paramètres technologiques des graines du haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	40

IV.4.1. Détermination des dimensions de la graine.....	40
IV.4.2. Détermination de la masse de 100 graines	40
IV.4.3. Test de cuisson et détermination de l'indice de gonflement des graines.....	40
IV.4.4. Détermination de la Capacité de fixation d'eau et de la capacité de fixation d'huile des graines	40
IV.5. Mise au point du diagramme technologique de fabrication de la farine du haricot niébé	
<i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	41
IV.5.1. Conditionnement des graines	41
IV.5.2. Décorticage des graines du haricot niébé	41
IV.5.3. Séchage des graines de haricot niébé	42
IV.5.4. Broyage des graines du haricot niébé.....	42
IV.5.5. Tamisage	42
IV.6. Détermination des paramètres technologiques de la farine du haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	42
IV.6.1. Détermination de l'Indice de gonflement de la farine.....	42
IV.6.2. Détermination de la Capacité de fixation d'eau et capacité de fixation d'huile de la farine...	43
IV.6.3. Réalisation des coupages entre la farine du haricot niébé et les farines de maïs et de riz.....	43
IV.6.4. Détermination de la composition biochimique de la farine composée des farines du haricot niébé et des farines de maïs et de riz.	44
IV.6.5. Détermination des aptitudes à la panification de la farine composée des farines du haricot niébé, et des farines de riz et de maïs	44
CHAPITRE V : RÉSULTATS ET DISCUSSION	46
V.1. Évaluation de la réactivité et de la sensibilité clinique vis-à-vis du haricot niébé chez des patients allergiques aux légumineuses	46
V.2. Identification des protéines allergènes	53
V.3. Réactivités croisées entre les protéines allergènes du haricot niébé et les protéines allergènes d'autres légumineuses alimentaires	59
V.4. Analyse de la composition biochimique et composition en macroéléments de la graine du haricot niébé	75
V.4.1. Analyse de la composition biochimique.....	75
V.4.2. Analyse de la composition en cendres, et de la composition en microéléments et en oligo-éléments.....	77
V.5. Caractérisation technologique du haricot niébé <i>Vigna unguiculata (L.) Walp</i>	78
V.6. Processus de fabrication de la farine du haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	79
III. 6.1 Caractérisation technologique de la farine de haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	80
IV.6.2. Formulation et caractérisation biochimique des farines à base de haricot niébé.....	82

III.6.3. Essai de panification.....	84
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
ANNEXE	106

Liste des figures

Figure N° 1 : Aspect des graines d'haricot niébé cultivées en Algérie <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	16
Figure N° 2 : hétérogénéité d'aspects des différentes espèces et sous espèces d'haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i> (69).....	17
Figure N° 3: Profil des réactivités des patients vis à vis des légumineuses alimentaires selon les tests de provocation cutané (Prick Test). Les valeurs médianes sont représentées par une ligne.	47
Figure N° 4 : Profil des réactivités IgEs des patients vis à vis des légumineuses alimentaires.....	48
Figure N° 5: Immunoblot monodimensionnel de l'extrait protéique d'haricot niébé.	54
Figure N° 6: Électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium de dodécylsulfate SDS-PAGE 2D de l'extrait protéique de l'haricot niébé coloré en SYPRO	55
Figure N° 7: Immunoempreinte 2D des protéines de l'haricot niébé obtenues apres incubation avec le sérum du patient 2.	56
Figure N° 8: Alignement de la séquence d'acides aminés de la viciline de l'haricot niébé (n° d'accession A8YQH5) avec les séquences d'acides aminés des allergènes de l'haricot mungo (n° d'accès Q198W3), soja (n° d'accès O22120), pois (n° d'accès Q702P1), lentille (n° d'accès n°Q84UI1), lupin (n° d'accès B8Q5G0) et arachide (n° d'accès P43238)..	62
Figure N° 9: A - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante (SDS-PAGE) de l'extrait protéique de l'haricot niébé (C) et de la fraction enrichie en viciline (V) obtenues par précipitations successives au chlorure de sodium (A).....	63
Figure N° 10: Inhibition ELISA de la liaison des IgE aux protéines de pois (A) et d'arachide (B) à l'aide d'extrait de haricot niébé (inh C) et d'une fraction enrichie en viciline (inhV).	64
Figure N° 11: Diagrammes électrophorétiques des extraits protéiques brutes préparés à partir de C : haricot niébé, M :haricot mungo, L : lentille, Pn : arachide, Lu : lupin, P : pois, S : soja)	67
Figure N° 12: Réponse des basophiles aux extraits de protéines d'arachide chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5)..	68
Figure N° 13: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de l'haricot niébé chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5).	69
Figure N° 14: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de lentille chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5)..	70
Figure N° 15: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de pois vert chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5)..	71
Figure N° 16: Réponse des basophiles aux extraits de protéines d' haricot mungo chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5).	72
Figure N° 17: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de soja chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5).....	73
Figure N° 18: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de lupin chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5).....	74

Figure N° 19: Diagramme technologique de fabrication de la farine de l'haricot niébé *Vigna unguiculata* L. Walp..... 81

Figure N° 20 : Aspect des produits de panification de la farine F1 (A) et F2 (B).....85

Liste des tableaux

Tableau N° 1: Classification des allergènes de certaines légumineuses alimentaires.....	3
Tableau N° 2: les allergènes identifiés de certaines légumineuses alimentaires (IUIS)	7
Tableau N° 3 : Réactivité croisée des cupines et prolamines de l'arachide (65)	14
Tableau N° 4 : Réactivité croisée des protéines homologues au Bet v 1, profilines, oléaosines et défensines de l'arachide (65)	15
Tableau N° 5 : formules des farines issues de l'haricot niébé et des farines de maïs et de riz	44
Tableau N° 6: Allergénicité des patients retenus à certaines légumineuses et résultats des tests cutanés et des immunoglobulines spécifiques (IgEs) mesurés par ImmunoCAP (thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden).....	49
Tableau N° 7: Allergènes de l'haricot niébé identifiés par électrophorèse 2D et Spectrométrie de Masse.	57
Tableau N° 8: Homologie des Séquences d'acides aminés des protéines allergènes de l'haricot niébé et celles de certaines légumineuses alimentaires.....	65
Tableau N° 9 : Teneur en eau et composition en macronutriments de l'haricot niébé.....	77
Tableau N° 10 : Teneur en cendres et composition en microéléments et oligo-éléments.....	77
Tableau N° 11: Caractéristiques technologiques de l'haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	79
Tableau N° 12 : caractéristiques technologiques de la farine de l'haricot niébé <i>Vigna unguiculata L. Walp</i>	82
Tableau N° 13 : Teneurs en eau et composition en Macronutriments, microéléments et en oligo-éléments des farines composées des farine de l'haricot niébé, de maïs et de riz.....	83
Tableau N° 14: Propriétés physiques, olfactives et gustatives des pains obtenus des farines composées de l'haricot niébé, de maïs, de riz, d'amidon de maïs et de féculs de pomme de terre	86

Liste des abréviations

Anti-FcεRI : Anticorps monoclonal spécifique aux récepteurs de haute affinité pour l'IgE

BSA : Serum bovine albumine

ANOVA: Analyse of Variance

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CD4 : Cluster de différenciation 4

DO: Densité optique

DTT : Dithiothreitol

DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque

FAO: Food and agriculture organisation

fMLP : N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine

HRP : Horseradish Peroxidase

IUIS: International Union of Immunological Societies

IL4 : Interleukines 4

IL13 : Interleukines 13

IgE : Immunoglobulines de type E

IgEs : Immunoglobulines de type E spécifique

IgA : Immunoglobulines A

Kt : Kilo tone

kD: Kilo Dalton

LTPns : Protéines de transfert de lipides non spécifiques

M : Molaire

MS : matière sèche

Mr : masse moléculaire

N : normalité

PBS : Sodium phosphate buffer

PT: prick test

Ppm : Partie par million

S : Svedberg

SAA : Spectrométrie d’Absorption Atomique

SAO : Syndrome d’allergie orale

TBST : Tris Buffered Saline with Tween

TPO : Test de provocation oral

TH2 : Lymphocyte T Helper 2

UI : Unité internationale

Introduction

Au cours des dernières décennies, la prévalence des allergies alimentaires a augmenté, touchant jusqu'à 10% de la population mondiale (1). L'arachide est l'une des sources d'allergènes les plus fréquentes (2). La fréquence des allergies à d'autres légumineuses, comme le soja, la lentille, le pois et le pois chiche, présente des variations géographiques basées sur les habitudes alimentaires (3). La majorité des allergènes identifiés dans les légumineuses appartiennent aux profilines, aux protéines liées à la pathogénèse, aux protéines de transfert lipidique non spécifiques, aux albumines 2S, aux globulines 11S et 7S. Beaucoup d'entre eux sont bien caractérisés (3). Il s'agit de glycoprotéines, de faibles masses moléculaires et de pH isoélectriques variant de l'acide au basique. Leurs principales caractéristiques résident dans leur résistance à la chaleur, à la protéolyse et à une acidité modérée grâce à leurs conformations tridimensionnelles compactes. C'est ce qui explique leur allergénicité persistante même après la cuisson et la digestion gastrique des aliments. Sous forme native, ils pénètrent dans la circulation sanguine et se lient aux IgE. La faible diversité des familles de protéines identifiées en tant qu'allergène suggère l'existence probable d'autres protéines allergisantes et de facteurs encore non déterminés et responsables de la sensibilisation allergique. Les protéines du haricot niébé ont une forte homologie de séquence avec les protéines de certaines légumineuses alimentaires telles que l'arachide, soja, pois et lentille. Cette homologie de séquence peut être source d'allergies croisées et expose les individus allergiques aux légumineuses alimentaires à un risque d'allergie croisée vis-à-vis du haricot niébé. Le haricot niébé revêt d'une importance majeure parmi les légumineuses alimentaires dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne, d'Amérique du Sud et d'Asie. En Algérie, il est cultivé principalement en Kabylie, à El-Kala, ainsi que dans certaines régions du sud du pays et constitue un important apport en nutriments. Ses protéines comme celles des autres légumineuses alimentaires sont riches en acides aminés essentiels, mais déficientes en acides aminés soufrés tels que la méthionine et la cystéine, d'où l'importance de la combinaison avec les céréales (tels que le riz et le maïs) afin d'équilibrer et d'enrichir les profils nutritionnels en acides aminés. Le haricot niébé a acquis une importance significative dans l'industrie alimentaire en raison de ses propriétés nutritionnelles et technologiques (4,5). Les réglementations en matière d'étiquetage des allergènes alimentaires exigent la mention de l'arachide et du

soja dans les produits alimentaires. Cependant, les autres légumineuses, à l'exception du lupin en Europe et en Australie, sont exemptées des politiques d'étiquetage des allergènes. À mesure que les tendances actuelles et futures de l'industrie alimentaire visent à utiliser davantage de sources de protéines durables, de plus en plus de légumineuses entreront sur le marché et vont représenter un potentiel risque de réactions allergiques pour les personnes sensibilisées. Ce travail de recherche s'inscrit dans ce contexte, et vise à évaluer le potentiel allergénique du haricot niébé et de contribuer à introduire de nouvelles normes d'étiquetages pour les produits contenant des légumineuses alimentaires connues pour leur allergénicité.

RECHERCHE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : LES ALLERGIES AUX LEGUMINEUSES ALIMENTAIRES

Les allergies alimentaires surviennent lorsque le système immunitaire réagit de manière inappropriée aux protéines présentes dans les aliments, les percevant comme étrangères. La réaction immunitaire déclenche des symptômes allergiques. Il est important de noter que les réactions allergiques peuvent varier d'une personne à l'autre, une protéine peut être allergène pour une personne, mais pas pour une autre. L'anaphylaxie, une réaction allergique grave, affecte une proportion considérable de la population, avec une prévalence d'environ 6 à 8 % chez les enfants et 4 % chez les adultes **(6-9)**. L'arachide, le soja, le blé, le lait de vache, les œufs de poule, le poisson et les crustacés sont responsables de plus de 90 % des allergies alimentaires. Une consommation de légumineuses peut entraîner une sensibilisation chez certaines personnes **(10-12)**. De nombreux rapports scientifiques in vitro décrivent le potentiel allergénique de plusieurs légumineuses, notamment l'arachide, le soja, le lupin, la lentille, le pois et le gramme noir **(13,14)**. De plus, des études récentes montrent que le gramme rouge, le haricot mungo, le haricot rouge et le pois chiche peuvent également être source d'allergies **(15,16)**.

I.1. Prévalence des allergies aux légumineuses alimentaires dans le monde

Ces dernières décennies, la prévalence des maladies allergiques a connu une augmentation significative **(17-20)**. L'allergie à l'arachide est courante au Royaume-Uni, en France, en Suisse et dans le nord de l'Amérique, alors que la prévalence la plus élevée d'allergie au soja est trouvée au Japon **(21)**. Le lupin est connu comme source d'allergie. Il est classé neuvième au rang dans la catégorie des « allergènes à risque » **(22)**. La prévalence de la sensibilisation au lupin est estimée à 1.4 % et 4 % en Europe et dans les pays méditerranéens respectivement **(23,24)**. L'allergie au lupin présente une sensibilisation croisée à l'arachide **(25,26)**. Il est également signalé que la lentille et le pois chiche peuvent provoquer des réactions d'hypersensibilité médiées par les IgE, en particulier chez les enfants **(27,28)**. En Espagne, la fréquence des allergies à la lentille et au pois chiche chez les enfants allergiques est estimée à environ 20 % de la population

(29). Cette variation des prévalences d'un pays à un autre peut être expliquée par des facteurs génétiques, culturels, environnementaux et par les habitudes alimentaires.

I.2. Prévalence des allergies alimentaires en Algérie

La prévalence des allergies aux légumineuses alimentaires en Algérie est peu documentée dans la littérature. Trois études récentes ont été réalisées sur Alger et Skikda respectivement. À l'est d'Alger, une cohorte de 690 enfants de moins de 5 ans est retenue. Les prévalences de l'allergie alimentaire auto-déclarée sont estimées à 5.9%. Après examen clinique (historique clinique, test de provocation cutané et dosage des IgE spécifiques), cette prévalence chute à 3.2 %. La prévalence d'allergie alimentaire baisse davantage après réalisation des tests de provocation orale (TPO) jusqu'à 2%. (30). À l'ouest d'Alger, deux mille cinq cents questionnaires sont distribués dans 63 établissements scolaires. La prévalence cumulée et la prévalence ponctuelle de l'allergie alimentaire sont estimées respectivement à 1,75 % et 2,24 %. Les allergènes responsables des manifestations cliniques sont ceux des légumineuses (22 %), des poissons et fruits de mer (23 %), du lait (15 %), l'œuf et les fruits rosacés sont responsables chacun de 8 % de l'ensemble des réactions allergiques alimentaires. (31). Au niveau de la wilaya de Skikda. Une enquête a été menée auprès de 1500 enfants âgés de 0 à 15 ans. La prévalence de l'allergie alimentaire est estimée à 2,13 % de la population étudiée. Le lait et les produits laitiers, les œufs et les fruits sont responsables de 81 % des réactions allergiques (32).

I.3. Mécanismes de développement des allergies alimentaires

Les réactions allergiques d'origine alimentaire sont classées en deux groupes selon le type de réaction immunitaire impliquée. Il s'agit des symptômes médiés par l'immunoglobuline E (IgE) et les symptômes gastro-intestinaux non médiés par les IgE. Chez les enfants, la sensibilisation survenant dans le tractus gastro-intestinal résulte d'une rupture de tolérance orale, qui survient le plus souvent de manière très précoce dans la vie. Une diminution des sécrétions gastriques chez les jeunes enfants et l'utilisation des inhibiteurs de pompes à protons sont suspectées de jouer un rôle important dans le développement de l'allergie

alimentaire (3). À cela, il est ajouté plusieurs facteurs, notamment la perméabilité des muqueuses membranaires à la naissance, la faible sécrétion de mucus chez les nouveau-nés, ainsi que l'excès de production d'IgE aux contacts précoces des allergènes. C'est ce qui explique pourquoi les jeunes enfants sont plus fréquemment sujets à des allergies en comparaison aux adultes. L'allergie aux légumineuses alimentaires est provoquée majoritairement par des mécanismes à médiation IgE. Il existe plusieurs façons d'empêcher l'entrée d'antigènes étrangers comme la sécrétion de mucus à la surface interne des cellules épithéliales intestinales, la sécrétion d'immunoglobuline A (IgA) par les plasmocytes locaux, la digestion partielle des protéines alimentaires par les protéases, ainsi que par l'acidité gastrique. Malgré ces barrières, les antigènes alimentaires peuvent atteindre les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les lymphocytes CD4+ natives (Th2) activées sécrètent des médiateurs de type interleukines IL-4 et IL-13, favorisant la sécrétion spécifique d'IgE par les cellules plasmatisques. L'ingestion du même antigène alimentaire provoque la dégranulation des mastocytes pour libérer les médiateurs secondaires qui provoquent la vasodilatation, la contraction des muscles lisses et la sécrétion de mucus. Cela mène au développement des symptômes allergiques (3). Il y a d'autres parts, des réactions allergiques à médiation cellulaire qui se développent lentement en 6 à 8 h, atteignant un pic à environ 48 h après l'ingestion de la nourriture. Leurs mécanismes sont principalement pilotés par les éosinophiles ou résultants d'une inflammation médiée par les lymphocytes T. Ces réactions allergiques impliquent l'interaction entre les allergènes et les cellules T qui libèrent des médiateurs inflammatoires engendrant des symptômes allergiques (3).

I.4. Méthodes de diagnostic des allergies alimentaires

I.4.1 Test cutané et dosage des IgE

Les tests cutanés, tels que les tests de provocation cutanés (prick-tests, PT) et les tests intradermiques, sont largement utilisés pour détecter les réactions allergiques immédiates. Il est appliqué une petite quantité de l'allergène sur la peau, généralement au niveau de l'avant-bras. Il est observé les réactions cutanées après quelques minutes. Le test sanguin de dosage d'IgE est un examen utilisé pour mesurer la quantité d'IgE dans le sang. Les IgE sont des anticorps produits par le système immunitaire, principalement impliqués dans les

réactions allergiques. Lorsqu'une personne est exposée à un allergène, comme le pollen, les poils d'animaux, ou certains aliments, son système immunitaire produit des IgE en réponse (33,34).

I.4.2. Test de provocation oral

Le test de provocation oral (TPO) est considéré comme la référence pour le diagnostic des allergies alimentaires. Il s'agit de l'administration progressive de quantités croissantes de l'allergène suspecté par voie orale, sous la supervision d'un professionnel de santé. Pendant le test, les réactions cliniques telles que les éruptions cutanées, les troubles gastro-intestinaux et les difficultés respiratoires sont bien surveillées. Le TPO permet de confirmer ou d'exclure une allergie alimentaire après l'ingestion de l'allergène suspecté. L'étude menée par **Sicherer et al. 2012 (35)** montre que le TPO est plus sensible et spécifique que les tests cutanés et les dosages spécifiques des IgE pour le diagnostic des allergies alimentaires. Une autre étude réalisée par **Nowak-Wegrzyn et al. 2009 (36)** précise que le TPO est un outil précieux pour évaluer la tolérance aux allergènes alimentaires chez les enfants.

CHAPITRE II : LES PROTÉINES ALLERGÈNES

II.1. Les Caractéristiques des protéines allergènes

Lorsqu'une personne allergique consomme un aliment contenant l'allergène auquel elle est sensible, son système immunitaire réagit de manière excessive, produisant des anticorps appelés immunoglobulines E spécifiques (IgEs). Ces anticorps provoquent la libération de l'histamine qui entraîne des symptômes allergiques (3). L'allergie alimentaire à médiation IgE est divisée en deux types selon le schéma de sensibilisation des allergènes : les allergènes alimentaires de classe 1 font référence aux allergènes alimentaires les plus courants et les plus fréquemment responsables de réactions allergiques chez les individus sensibilisés. Ils ont un potentiel élevé de provoquer des réactions allergiques graves et sont stables à la chaleur et à l'acidité gastrique. Les allergènes de légumineuses font partie de cette catégorie (37). Les allergènes alimentaires de classe 2 sont sensibles à la chaleur et à la digestion gastrique et sont connus sous

le nom d'allergènes alimentaires mineurs, parce qu'ils peuvent également provoquer des réactions allergiques chez certaines personnes sensibilisées, mais ces réactions sont généralement moins fréquentes et moins sévères que celles provoquées par les allergènes de classe 1. Les protéines allergènes du blé entrent dans cette catégorie (38). Une protéine est reconnue comme allergène si elle présente la capacité de liaison aux anticorps IgE spécifiques et de provoquer une réaction allergique. Les épitopes linéaires et tridimensionnels de l'allergène représentent les sites de fixation des anticorps et sont responsables du déclenchement de la réaction allergique chez un individu sensibilisé. Pendant la digestion, les allergènes perdent leurs structures spatiales et se présentent sous forme d'une structure primaire (3). La majorité des allergènes sont des glycoprotéines. Elles sont stables à la chaleur et à l'acidité modérée et sont résistantes à l'action des protéases. La sensibilisation et le potentiel allergénique ne dépendent pas de la dose d'allergène. Les allergènes peuvent sensibiliser une personne même à des niveaux inférieurs au microgramme. La glycosylation contribue à l'allergénicité d'une protéine, des allergènes comme Ara h1, Gly m Bd60K, Gly m Bd28K sont fortement glycosylés. La fraction glycane peut également interagir avec les IgE (3, 38).

II.2. Classification des protéines allergènes des légumineuses alimentaires

Quatre familles et superfamilles de protéines allergéniques identifiées chez les légumineuses : super famille des prolamines, superfamille des cupines, superfamille des profilines et superfamille des protéines liées à la pathogénèse. Les protéines de stockage sont la fraction la plus abondante au niveau du protéome des légumineuses, elles comptent jusqu'à 80% des protéines totales. Elles sont généralement résistantes à la digestion trypsique et à la dénaturation thermique. La structure chimique des protéines de stockage est généralement considérée comme beaucoup plus stable à la chaleur et aux protéases par rapport aux profilines et aux protéines liées à la pathogénèse. Les protéines de stockage des graines sont souvent désignées selon leur vitesse de sédimentation (les globulines 7/8 S et 11S appartiennent aux Cupines, alors que les albumines 2S appartiennent aux Prolamines) (3). Les différentes classes de protéines allergènes, ainsi que la nature biochimique et la nomenclature des allergènes sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1: Classification des allergènes de certaines légumineuses alimentaires

Familles	Dénomination biochimique des allergènes	Source et nomenclature des allergènes
Superfamille des prolamines	Albumine 2S	Gly m 8 (Soja), Ara h 2 (Arachide), Ara h 6 / Ara h 7,
	Alpha amylase/inhibiteur de la trypsine	
	LPTns	Lup an 3 (lupin), Len c 3 (lentille), Pis s 3 (pois vert), Ara h 9, Ara h 16, Ara h 17 (arachide)
Superfamille des cupines	Vicilines 7S	Lup an 1 (lupin), Len c 1 (lentille), Pis s 1, Pis s 2 (pois vert), Gly m 5 (soja), Ara h1 (arachide), Ses i 3 (Sésame)
	Légumine (11S)	Ses i 6 (sesame), Gly m 6 (soja), Ara h 3 (arachide)
Superfamille des profilines	Oléosines, défensines,	Ara h 5, Ara h 10, Ara h 11, Ara h 12, Ara h 13, Ara h 14, Ara h 15 (Arachide) , Gly m 3, Gly m 2 (Soja)
Superfamille des Bet v1 (PR-10 protéines)	Protéines homologues aux bet v 1 (protéines liées à la pathogénèse)	Gly m 4 (soja), Ara h 8 (Arachide)

II.2.1. Superfamille des prolamines

La superfamille des prolamines forme actuellement le groupe d'allergène le plus répandu chez les végétaux. Elle comprend les protéines de stockage des graines et les protéines de faibles masses moléculaires riches en soufre et certaines glycoprotéines des parois cellulaires. Les albumines 2S, les protéines de transfert de lipides non spécifiques, les inhibiteurs de la α -amylase et des protéases des céréales font partie de cette famille.

II.2.1.1 Albumines 2S

Protéines monomériques de masse moléculaire variant de 10 à 18 kDa composées de deux chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures. Elles sont formées de deux sous-unités. Il existe une grande sous-unité de 8 à 10 kDa et une petite sous-unité de 3 à 4 kDa. L'Ara h 2 de l'arachide n'a pas de sous-unités. Il est formé d'une seule chaîne polypeptidique stabilisée par des ponts disulfures. Des réactivités croisées entre les albumines 2S de noix, d'arachide et d'amande sont signalées. Les albumines 2S peuvent déclencher des réactions immunologiques graves et systématiques, comme c'est le cas de l'Ara h 2 et de l'Ara h 6 de l'arachide (39).

II.2.1.2. Protéines de transfert de lipides non spécifiques (LTPns)

Les LTPns représentent jusqu'à 4 % de la fraction protéique soluble. La majorité de ces molécules sont des protéines extracellulaires associées aux parois cellulaires. Elles sont une cause fréquente d'allergie alimentaire chez la population adulte, avec une prévalence élevée de sensibilisation dans la région Méditerranéenne. Elles ont une M_r variant de 9,5 à 10,5 kDa avec une structure tridimensionnelle très compacte et stable. Le repliement des hélices donne une cavité hydrophobe en forme de tunnel le long de l'axe de la molécule. Elles sont adaptées à la liaison avec une grande variété de lipides. Les différences d'affinités de liaisons aux lipides des LTPns peuvent se refléter dans diverses activités immunomodulatrices, à la fois en modifiant leurs structures moléculaires et leurs propriétés physico-chimiques, et en agissant directement sur le système immunitaire (39). Les réponses allergiques induites par les LTPns sont le plus

souvent décrites comme sévères (anaphylaxie), bien que des symptômes légers puissent survenir. En raison de leur large distribution dans le règne végétal, les LTPns allergéniques sont couramment classées comme des panallergènes, c'est-à-dire des protéines omniprésentes responsables de la réactivité croisée des IgE avec une multitude de sources allergéniques apparentées et non apparentées (39).

II.2.2. Superfamille des Cupines

La superfamille des cupines partage deux motifs de séquences consensus conservés et un domaine central structurel en tonneau β . Parmi les protéines allergènes les plus connues de cette famille, il y a le Gly m 5, Gly m6 du soja, et l'Ara h 1 ainsi que l'Ara h 3 de l'arachide. (3).

II.2.2.1. Légumineuses

Les légumineuses sont des protéines multimériques avec des structures quaternaires de $M_r = 360$ kDa (globulines 11S). Elles représentent 50 à 70 % des protéines totales et se présentent sous forme d'hexamères ou d'un mélange de trimères et d'hexamères, liés par des interactions non covalentes (39). Différents gènes expriment chaque monomère en tant que chaîne principale unique de $M_r = 60$ kDa, qui est clivée post-traductionnellement en un polypeptide acide et un polypeptide basique de M_r allant de 30 à 40 kDa et $M_r = 20$ kDa respectivement. Ils sont maintenus ensemble par des liaisons disulfures. Jusqu'à présent, plusieurs légumineuses sont identifiées comme allergènes dans les légumineuses comme l'Ara h 3 de l'arachide et le Gly m 6 du soja (39).

II.2.2.2 Viciline

Les vicilines sont des protéines de Mr variant de 150 kDa à 190 kDa et représentent environ 20 % des protéines totales des légumineuses. Elles ont une structure trimérique avec des sous-unités protéiques de masses moléculaires caractéristiques variant de 40 à 80 kDa. Ces sous-unités sont souvent glycosylées sur un ou deux sites de glycosylation situés dans le domaine C-terminal. Les vicilines présentent deux domaines centraux en forme de tonneau β , mais contrairement aux légumineuses, elles ne possèdent pas de liaisons disulfures et sont stabilisées par des interactions hydrophobes non covalentes, des liaisons hydrogène et des interactions de Van der Waals. Plusieurs vicilines sont identifiées comme des allergènes dans les légumineuses, comme l'arachide (Ara h 1), le lupin (Lup an 1) et le pois (Pis s 1) (39).

II.2.3. Superfamille des protéines liées à la pathogénèse (PR protéines)

Les protéines PR-10 constituent un groupe important d'allergènes et sont liées aux allergies alimentaires associées au pollen. À ce jour 29 protéines sont classées comme des molécules allergènes, dont 25 sont répertoriées dans la liste des allergènes de l'OMS/IUIS. Les protéines PR-10 ont une Mr de 15 à 17 kDa. Elles sont légèrement acides et résistantes aux protéases. Elles présentent un feuillet β antiparallèle fortement incurvé, composé de sept brins, entourant une longue hélice α de 25 acides aminés ($\alpha 3$) à l'extrémité C-terminale. Deux courtes hélices α supplémentaires ($\alpha 1$ et $\alpha 2$), situées entre les brins $\beta 1$ et $\beta 2$, complètent la structure en créant un noyau hydrophobe qui sert de site de liaison aux ligands. La pertinence clinique de ces protéines englobe une multitude de symptômes différents allant de légers à potentiellement graves. Ces symptômes apparaissent au bout de quelques minutes après la consommation d'aliments végétaux crus sources d'allergies (39).

II.2.4. Superfamille des Profilines

Les profilines sont des protéines de Mr allant de 12 kDa à 15 kDa. L'Ara h 5 de l'arachide et le Gly m 3 du soja font partie des allergènes caractérisés de cette famille (3). Elles sont sensibles à la chaleur et aux protéases et sont principalement responsables du syndrome d'allergie orale (SAO) (39). Leurs structures

comprennent trois hélices α , sept brins β et dix boucles qui forment deux cœurs hydrophobes séparés par un feuillet β central à six brins. Elles sont classées comme des panallergènes importants, bien que l'étendue de leur allergénicité fait encore l'objet de discussions, compte tenu de la variabilité extrême de leur pertinence clinique, qui dépend du type d'aliment. Les symptômes sont dans la plupart des cas légers, mais il existe également des rapports de réponses allergiques graves (39).

II.3. Les protéines allergènes de certaines légumineuses alimentaires

Le nom et les caractéristiques des allergènes connus de l'arachide, le soja, le lupin, les lentilles et les pois verts sont résumés dans le tableau 2.

II.3.1. Les protéines allergènes de l'arachide

L'arachide *Arachis hypogaea* est, appartient à la sous-famille des papilionacées. L'arachide est consommée dans de nombreuses régions du monde. Elle est particulièrement populaire en Afrique de l'Ouest, où elle est souvent utilisée dans des plats traditionnels comme le maffé (une sauce aux arachides) et le yassa. En Amérique du Sud, notamment au Brésil et en Argentine, les arachides sont souvent consommées grillées ou sous forme de pâte d'arachide (40). Aux États-Unis, le beurre d'arachide est un aliment de base. Cette légumineuse alimentaire est riche en protéines (23-27%) et constitue une source fréquente d'allergènes alimentaires (41). L'IUIS (International Union of Immunological Societies) répertorie 18 allergènes caractérisés dans l'arachide. L'ensemble des allergènes décrits représentent plus de 75% des protéines de l'arachide. L'Ara h 1 (7S globuline, 63.5 kDa), Ara h 2 (albumine 2S, 17 kDa) sont considérés comme des allergènes majeurs. Plus de 95% de patients allergiques à l'arachide sont sensibles à Ara h 1 et Ara h 2. Ces derniers sont thermostables et résistants à l'hydrolyse enzymatique, notamment lors du processus de digestion. L'Ara h 3 et l'Ara h 4 appartiennent également à la famille des globulines et sont des isoformes avec une homologie de séquence supérieure à 90%. Ils sont présents sous forme de polypeptides de Mr variant de 36 à 60 kDa, et résultent d'une protéolyse naturelle au cours de la maturation de la plante. L'Ara h3 et l'Ara h 4 sont reconnus par 44% des IgE de sérums de patients allergiques (42-46).

Tableau 2: les allergènes identifiés de certaines légumineuses alimentaires (**IUIS**)

Espèce	Allergène	Dénomination biochimique	Mr	Voie d'exposition
Arachide <i>Arachis hypogaea</i>	Ara h 1	Globuline 7S	64	Aliments
	Ara h 2	Conglutinine (albumine 2S)	17	Aliments
	Ara h 3	Globuline 11S	60/37	Aliments
	Ara h 4	Renommé Ara h 3		Aliments
	Ara h 5	Profiline	15	Aliments
	Ara h 6	Conglutinine (albumine 2S)	15	Aliments
	Ara h 7	Conglutinine (albumine 2S)	15	Aliments
	Ara h 8	Protéine liée à la pathogénèse	17	Aliments
	Ara h 9	LTPns type 1	9.8	Aliments
	Ara h 10	Oléosine	16	Aliments
	Ara h 11	Oléosine	14	Aliments
	Ara h 12	Defensine	8/12/5.2	Aliments
	Ara h 13	Defensine	8/11/5.4	Aliments
	Ara h 14	Oléosine	17	Aliments
	Ara h 15	Oléosine	17	Aliments
	Ara h 16	LTPns type 2	8.5	Aliments

	Ara h 17	LTPns type 1	11	Aliments
	Ara h 18	Cyclophiline	21	Aliments
Soja <i>Glycine max</i>	Gly m 1	Protéine hydrophobique	7	Air
	Gly m 2	Defensine	8	Air
	Gly m 3	Profiline	14	Aliments
	Gly m 4	Protéine homologue au Bet v 1	17	Aliments
	Gly m 5	Beta conglycinine (7S viciline)	Plusieurs fragments	Aliments
	Gly m 6	Glycinine (11S globuline)	Plusieurs fragments	Aliments
	Gly m 7	Protéine biotinylée des graines	76	Aliments
	Gly m 8	Albumine 2S	28	Aliments
Lupin <i>Lupinus angustifolius</i>	Lup an 1	Globuline 7S	55-61	Aliments
	Lup an 3	LTPns	11	Aliments
Pois vert <i>Pisum sativum</i>	Pis s 1	Viciline	44	Aliments
	Pis s 2	Convicine	63	Aliments
	Pis s 3	LTPns	9.5	Aliments
Lentille <i>Lens culinaris</i>	Len c 1	Viciline	47	Aliments
	Len c 2	Protéine biotinylée des graines	66	Aliments
	Len c 3	LTPns	9	Aliments

Parmi les allergènes de l'arachide, on peut également noter la présence d'allergènes homologues aux Bet v 1 du pollen de bouleau, c'est le cas notamment de l'Ara h 8, qui est un allergène majeur chez les patients avec une allergie à l'arachide secondaire à une allergie au pollen de bouleau par réactivité croisée (47). L'Ara h 8, une protéine liée à la pathogénèse de Mr=17 kDa reconnue par 85% des patients. L'arachide comprend également d'autres allergènes mineurs, notamment des oléosines (Ara h 10, Ara h 11, Ara h 14, Ara h 15), des défensines (Ara h 12, Ara h 13), des LTPns (Ara h 9, Ara h 16, Ara h 17), et des cyclophilines (l'Ara h 18). Ces allergènes sont présents en faible proportion dans le protéome de l'arachide est ont pour la majorité un rôle fonctionnel (enzymes, protection contre les parasites, des protéines de transfert...) (47-50). La nature biochimique, la dénomination des allergènes de l'arachide ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau 2.

II.3.2. Les protéines allergènes de lentille

La lentille *Lens culinaris*, une légumineuse méditerranéenne de la famille des Papilionacées. Les lentilles sont consommées dans de nombreuses régions du monde. Elles sont particulièrement populaires en Inde, au Moyen-Orient, en Europe, en Amérique du Nord et en Afrique. Trois protéines allergènes sont caractérisées dans les lentilles, elles appartiennent aux globulines et aux prolamines. Parmi les protéines allergènes, le Len c 1.01 est un allergène majeur de type glycoprotéique avec une masse moléculaire de 48 kDa. Sa séquence en acides aminés présente 50 % d'identité avec celles des vicilines issues de l'arachide et de soja. Le Len c 2 et le Len c 3 ont une Mr de 66 kDa et 9 kDa et sont considérés comme des allergènes mineurs (51-53). La nature biochimique, la dénomination des allergènes de la lentille ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau 2.

II.3.3. Les protéines allergènes du pois vert

Le pois vert *Pisum Sativum* est une légumineuse de la famille des *Fabaceae*. Il est consommé partout dans le monde, mais encore d'avantage dans la région méditerranéenne (Afrique du Nord et Europe). Parmi ses

avantages, la possibilité de son utilisation pour l'alimentation des nouveau-nés dès l'âge de 2 ans est très appréciée. Trois allergènes sont caractérisés dans le pois vert. Des globulines : Pis s 1 et Pis s 2, qui sont deux allergènes majeurs de masse moléculaire de 44 kDa et 63 kDa respectivement. Et une LTPns, allergène mineur de 9.5 kDa (**54, 55**). La nature biochimique, la dénomination des allergènes du pois vert ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau 2.

II.3.4. Les protéines allergènes du lupin

Le lupin est une légumineuse de la famille des Fabaceae, il est souvent utilisé dans l'alimentation humaine et animale. Il est apprécié pour sa richesse en protéines et en fibres. Toutefois, il peut également être une source d'allergènes pour certaines personnes. Il existe plusieurs espèces, mais le lupin doux *Lupinus angustifolius* est le plus couramment utilisé dans l'alimentation. Deux allergènes sont identifiés dans le lupin : le Lup an 1 et le Lup an 2. Les allergènes du lupin sont des allergènes majeurs, ils appartiennent à la famille des cupines et des prolamines (**56, 57**). La nature biochimique, la dénomination des allergènes du lupin ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau 2.

II.3.5. Les protéines allergènes du soja

Le soja est une légumineuse annuelle originaire de la Chine. Le soja est consommé dans de nombreuses régions du monde, notamment en Asie, où il est un aliment de base dans des pays comme la Chine, le Japon et la Corée du Sud et les États-Unis. En Europe il est utilisé dans de nombreux produits transformés, comme les barres énergétiques, les substituts de viande et les produits laitiers alternatifs. Sa popularité est en partie due à sa richesse en protéines (30-40%). L'IUIS répertorie 8 allergènes caractérisés dans le soja. Les protéines de réserve jouent un rôle important dans l'allergénicité du soja. En effet, ce dernier en compte 4 qui sont bien caractérisés (Gly m 5, Gly m 6, Gly m 7, Gly m 8). On note également la présence d'allergènes homologues aux Bet v 1 (Gly m 4) et d'autres allergènes de type profilines (Gly m3), défensines (Gly m 2), et protéines hydrophobes de soja (Gly m 1) (**58-62**). Le nom biochimique des allergènes du soja ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques sont résumés dans le tableau 2.

II.4. La réactivité croisée des allergènes d'origine alimentaire

II.4.1. Définition

La réactivité croisée des allergènes est définie comme la reconnaissance de deux allergènes ou plus par des anticorps ou des cellules T de la même espèce initialement générés contre l'un des allergènes croisés. Elle résulte de la similarité structurelle des zones de surface exposées au niveau de l'allergène et formant les épitopes allergéniques. Les allergènes responsables de réactivités croisées sont des allergènes homologues qui partagent des pourcentages d'identités élevées au niveau de leurs séquences protéiques **(63)**. L'identité de séquence fait référence au pourcentage d'acides aminés montrant une correspondance directe avec la séquence comparée lors d'un alignement. Il est généralement considéré que la réactivité croisée entre deux protéines est probable si l'identité de séquence est supérieure à 70 %, mais peu probable pour des valeurs inférieures à 50 %. Il existe plusieurs algorithmes pour déterminer le pourcentage de similarité des séquences de deux molécules ou plus, tels que FASTA ou BLAST. Des outils pour comparer la séquence et la structure des allergènes sur des régions plus petites comme le concept des propriétés physico-chimiques sous-jacent à l'outil de la Base de Données des Protéines Allergéniques (SDAP ; fermi.utmb.edu) sont disponibles en ligne **(63,64)**. L'homologie de séquence est basée sur la biologie évolutive qui décrit l'ascendance partagée de deux séquences. Une règle générale est que deux séquences sont homologues si elles partagent plus de 30 % d'identité de séquence. L'homologie de séquence est essentielle dans les analyses computationnelles des séquences protéiques et est souvent utilisée comme l'un des principaux paramètres pour évaluer la réactivité croisée entre deux molécules. Les allergies croisées sont des manifestations cliniques d'allergie provoquées par des protéines allergènes homologues sans qu'il y ait eu, au préalable, un premier contact sensibilisant. **(3, 22)**. La réactivité croisée entre les allergènes n'implique pas forcément une manifestation d'allergie au niveau clinique. La réactivité est croisée, lorsque les tests IgE spécifiques croisés sont positifs. La sensibilisation est croisée, en cas de tests cutanés croisés positifs. L'allergie croisée est uniquement vérifiée par le test de provocation orale et elle est responsable de manifestations cliniques. Il est fréquent que seuls les deux premiers tests soient positifs : ainsi, la réactivité

croisée entre l'arachide et d'autres légumineuses est observée dans 40% des cas alors que l'allergie croisée concerne 2% à 10% des sujets (22).

II.4.2. Les réactivités croisées des légumineuses alimentaires

Dans la famille des légumineuses alimentaires, les cupines (globulines et légumines), les prolamines (albumines et LTPns) et les profilines (PR10-protéines) sont identifiées comme les principales sources de protéines allergènes responsables de réactivité croisée. Ceci s'explique par la forte homologie de séquences d'acides aminés partagée entre les différentes protéines des légumineuses alimentaires (3). L'allergie aux légumineuses ainsi que la réactivité croisée est modulée par plusieurs facteurs : des facteurs génétiques spécifiques à la population affectée, des facteurs environnementaux et des facteurs culturels (habitudes alimentaires : type d'aliments consommés, fréquence de consommation et méthodes de cuisson...). Par exemple, les lentilles, les pois chiches et les petits pois sont largement consommés dans le bassin méditerranéen et une réactivité croisée significative existe entre eux, tandis qu'aux USA, l'arachide et le soja sont les principales sources d'allergie et de réactivité croisées, et la pertinence clinique des allergies aux autres légumineuses est considérée comme très faible (3). Dans la réactivité croisée des légumineuses, on distingue 3 agents causals : les protéines de stockage comme les vicilines sont principalement impliquées dans la réactivité croisée entre les légumineuses et sont des allergènes majeurs avec une grande homologie de séquences d'acides aminés. Cependant, seuls certains de leurs épitopes peuvent avoir une pertinence clinique. Des cas d'allergies dues à la réactivité croisée entre les vicilines des légumineuses sont documentés dans la littérature. Le cas de l'allergie à l'arachide est un exemple pertinent puisqu'elle peut être associée à l'allergie aux lentilles et au pois chiche. L'arachide est la légumineuse alimentaire la plus étudiée par rapport à son potentiel allergénique. En cause, sa capacité a déclenché des réactions immunitaires sévères pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique (40-46). Les allergènes de l'arachide pouvant déclencher des réactions croisées avec d'autres aliments et légumineuses sont résumés dans les tableaux 3 et 4 (65). La viciline de lentille Len c 1.02 présente plus de 50 % d'identité avec son homologue Ara h 1 de l'arachide (40, 52, 53). Les allergies aux pois verts sont souvent associées à l'allergie à la lentille, ceci a été démontré dans une

étude de 18 patients espagnols allergiques aux petits pois. La conviciline, un allergène majeur des petits pois, a montré une réactivité croisée avec l'allergène des lentilles Len c 1. Les allergènes Ara h 1 de l'arachide, Len c 1 de lentille et Pis s 1 du pois vert ont des épitopes communs, pouvant ainsi être responsables de la réactivité croisée entre ces légumineuses (**3, 53**). Les LTPns, sont des panallergènes et sont considérés comme un second agent causal d'allergie et de réactivité croisée. Les LTPns sont des allergènes mineurs impliqués principalement dans la survenue de réactivités croisées avec les noix, les fruits et les protéines de pollen. Ce type d'allergie et de réactivité croisée est connu sous le nom de syndrome des LTPns (LTPns Syndrom) (**65**). Dans le troisième agent causal, on retrouve la superfamille des profilines, avec les protéines reliées à la pathogenèse comme principale source d'allergie et de réactivité croisée au pollen. Ces protéines sont fortement homologues au bet v 1 et sont retrouvées dans le pollen des arbres, notamment le bouleau. Ceci est connu sous le nom de syndrome d'allergie au pollen (Pollen Food Allergy Syndrom PFAS) (**65**). Les allergènes identifiés à ce jour dans différentes légumineuses alimentaires et appartenant à ces familles de protéines allergènes sont résumés dans le tableau 2, 3 et 4.

Tableau 3 : Réactivité croisée des cupines et prolamines de l'arachide (65).

Superfamille de protéine	Cupines		Prolamines	
Famille de protéine	Globuline ou viciline 7 S	Globuline ou légumine 11 S	Albumine 2 S	LTPns
Allergène	Ara h 1	Ara h 3	Ara h 2, Ara h 6, Ara h 7	Ara h 9
Fonction biologique	Réserve de nutriments		Protection et défense contre les agents pathogènes	Protection et défense contre les agents pathogènes
Prévalence de réactivité IgE	30-80%	16-57%	Ara h 2 : 42-100% Ara h 6 : 86-92% Ara h 7 : 43%	8-60% Forte co-sensibilisation avec les allergènes de pêche
Réactivité croisée	Les vicilines 7 S des autres légumineuses (pois vert, lentille, pois chiche, lupin, soja) et avec l'Ara h 2 et l'Ara h 3	Legumineuses 11 S des autres légumineuses alimentaires et avec Ara h 1, Ara h 2 et Ara h 6.	Ara h 2 : avec les albumines 2 S des amandes et avec l'Ara h 1, Ara h 3 et Ara h 6.	Les LTPns des noisettes et des pêches (Prup p 3 et Cor a 8)

Tableau 4 : Réactivité croisée des protéines homologues au Bet v 1, profilines, oléosines et défensines de l'arachide (65).

Superfamille de protéine	Protéines homologues au bet v 1	Profiline	Glycoyl transférase GT-C		Scorpion toxin like knottin	
Famille de protéine	Famille des Bet v 1	Profiline	Oléosine		défensine	
Allergène	Ara h 8	Ara h 5	Ara h 10	Ara h 11	Ara h 12	Ara h 13
Fonction biologique	Protéine de transport	Module la polymérisation et la dépolymérisation des monomères d'actine	Protéines structurales des corps gras dans les graines		Protection et défense contre les agents pathogènes	
Prévalence de réactivité IgE	22-66%, cliniquement pertinents pour les patients souffrants d'allergies au pollen	3-24%	Inconnue		Inconnue	
Réactivité croisée	Bet v 1 et les autres protéines de la famille PR-10	Bet v 2 et les autres profilines	Les oléosines du soja et du sarrasin		Inconnue	

CHAPITRE III : LE HARICOT NIEBE (*Vigna unguiculata* L. Walp)

III.1. Généralité et origine

Le haricot niébé (*Vigna Unguiculata*) est une légumineuse annuelle de la famille des Fabaceae. Il est principalement cultivé en Afrique, où il constitue une source essentielle de protéines. Connue sous divers noms comme haricot à œil noir, cowpea, dolique ou niébé. En Algérie, le haricot niébé est communément appelé Loubia ou Tadellagh dans la région d'Adrare au sud d'Algérie (**Figure 1**). Il est cultivé et consommé de façon traditionnelle en Kabylie, El teref et les oasis du Sahara (**66**).

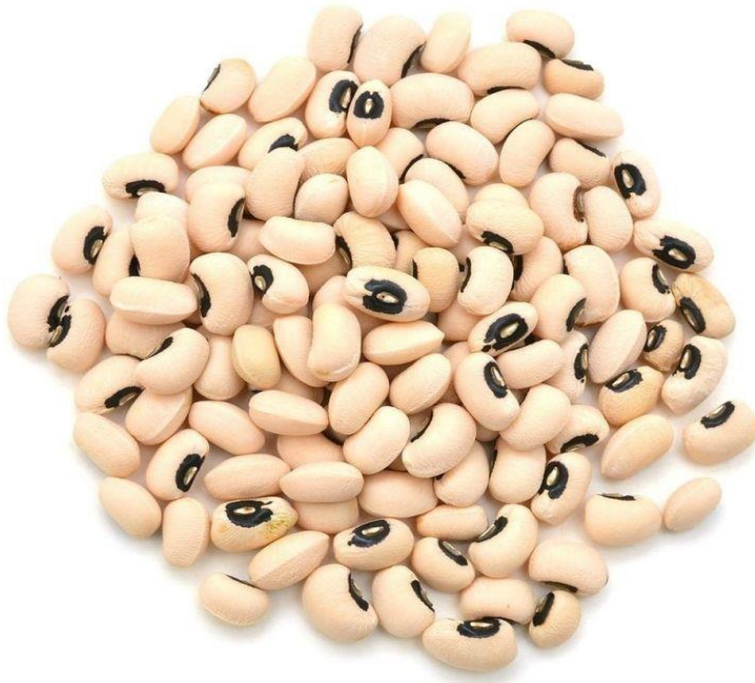


Figure 1 : Aspect des graines du haricot niébé cultivées en Algérie *Vigna unguiculata* L. Walp

Le haricot niébé présente une grande variabilité en termes de croissance, de morphologie, de maturité et de types de graines (**66**). Les graines du niébé présentent une grande diversité dans l'apparence, notamment en ce qui concerne la taille et la couleur des graines, ainsi que la couleur et la taille de l'œil (**Figure 2**) (**67-68**). Sa longue racine pivotante et ses caractéristiques d'adaptation, telles que l'orientation des feuilles pour minimiser la chaleur et la fermeture des stomates pour résister à la sécheresse, améliorent sa capacité à

prosperer dans des conditions arides. En tant que légumineuse, le haricot niébé contribue également à la santé du sol en fixant l'azote atmosphérique (67). Le haricot niébé est domestiqué pour la première fois en Afrique entre 1700 et 1500 avant notre ère (68), et toutes les variétés cultivées actuellement dans le monde proviennent d'Afrique de l'Est et de l'Ouest. L'importance actuelle du niébé en tant que plante agricole provient principalement de son utilisation comme culture de graines riches en protéines à cycle court pour la consommation humaine ou animale. Sur le marché africain, les graines de niébé récoltées constituent une alternative économique aux aliments moins abordables issus de l'élevage et de la pêche. Les feuilles du niébé peuvent être récoltées au besoin pendant les périodes de pénurie alimentaire, tandis que la collecte de la biomasse aérienne peut être valorisée pour la production de fourrage (67-69).



Figure 2 : hétérogénéité d'aspects des différentes espèces et sous-espèces du haricot niébé *Vigna unguiculata* L. Walp(69)

III.2 Taxonomie

Le haricot niébé *Vigna unguiculata* appartient à l'ordre des Fabales, famille des Fabaceae, Tribu des Phaseoleae, genre *Vigna* :

Classe : *Dicotyledone*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *Faboideae*

Tribu : *Phaseolae*

Sous-tribu : *Phaseolinae*

Genre : *Vigna*

Espèce : *Vigna Unguiculata*.

Le haricot niébé annuel comprend 2 variétés botaniques : le *Vigna unguiculata var unguiculata* correspond à la variété domestiquée et cultivée, tandis que la variété *Vigna unguiculata var spontanea* est considérée comme sauvage. Il est trouvé dans les abords des champs de culture et à l'intérieur. L'espèce *Vigna unguiculata* cultivée comprend 5 cultivars d'instinct en fonction l'apparence des graines, et de la plante, il s'agit de : *Biflora*, *Melanophthalmus*, *Sesquipedalis*, *Textilis* et *Unguiculata* (66-69).

III.3. Production à l'échelle mondiale et importance économique

Le haricot niébé est cultivé principalement en Afrique. Une culture destinée aussi bien à l'alimentation humaine qu'animale. Au cours des dernières décennies, la production de niébé a connu une expansion mondiale avec plus de 87 % de la production mondiale provenant d'Afrique. Les dix principaux producteurs de niébé en 2017 étant le Nigéria avec 3 410 milliers de tonnes, le Niger (1 959 kt), le Burkina Faso (604 kt), la République-Unie de Tanzanie (201 kt), le Cameroun (198 kt), le Myanmar (179 kt), le Kenya (146

kt), le Mali (145 kt) et le Soudan (130 kt). En Amérique du Sud, le Brésil a récemment augmenté sa culture de niébé (749 kt), plaçant le pays au troisième rang mondial en termes de superficie et de production **(66-73)**. Depuis 2008, le Brésil a exporté le niébé vers des pays comme l'Inde, Israël, le Pakistan, la Turquie, les Émirats arabes unis, Singapour, l'Indonésie, le Népal, le Vietnam, le Portugal et l'Italie. Le niébé est économiquement important pour l'Afrique. La majorité des exportations et des importations de niébé se fait au sein de l'Afrique. Le Niger, le Burkina Faso, le Bénin, le Mali, le Cameroun, le Tchad et le Sénégal sont des exportateurs nets, tandis que le Nigéria, le Ghana, le Togo, la Côte d'Ivoire, le Gabon et la Mauritanie sont des importateurs **(66-73)**.

III.4. Les composés nutritifs

La plupart des données sur la composition nutritionnelle concernent les graines entières de niébé, bien que des informations limitées soient disponibles pour les graines décortiquées, les graines germées et les feuilles. Les graines entières incluent la peau de la graine, qui représente 6 % de la matière sèche des graines. Le niébé est morphologiquement divers et adapté à différents environnements, ce qui entraîne une large gamme de variétés locales. La composition nutritionnelle est influencée par des caractéristiques génétiques, des conditions agroclimatiques, un stress biotique et la gestion post-récolte. Le haricot niébé est très nutritif et offre des avantages potentiels pour la santé en raison de sa teneur élevée en protéines, en fibres et de son faible indice glycémique **(66-69)**.

III.4.1. Glucides et Fibres

Les glucides représentent la majorité du poids sec des graines de niébé. Huit glucides sont identifiés dans le haricot niébé : le saccharose (11-19 g/kg), le glucose (4-5 g/kg), le fructose (1-2 g/kg), le galactose (≤ 15 g/kg), le maltose (≤ 11 g/kg) ; et trois glucides considérés comme anti-nutriments, la stachyose (17-60 g/kg), la verbascose (6-13 g/kg) et le raffinose (5-10 g/kg) **(66)**. La teneur en fibres brutes des graines de niébé varie de 2,5 % à 32 % de la matière sèche totale. La teneur en fibre diminue dans les graines décortiquées. Les moyennes de fibres alimentaires totales, insolubles et solubles de niébé décortiqué, rapportées par Khan

et al. (2007), sont respectivement de 18,2 %, 14,8 % et 3,3 % de la matière sèche. La fibre alimentaire totale comprend la cellulose (6 %), l'hémicellulose (3,9 %), la lignine (2 %) et la pectine (1,8 %) (67).

III.4.2. Protéines et acides aminés essentiels

Le haricot niébé constitue une source significative de protéines avec des teneurs de protéines variant de 16 % à 31 %. La majorité des protéines de la le haricot niébé sont constituées de globulines (51 %) et d'albumines (45 %). Les prolamines et les glutélines sont présentes en très faibles quantités (< 3%) (67-69). Les albumines comportent principalement des composés 2S, 7S et plus rarement 11S. Elles sont stables à la protéolyse et peuvent être source d'allergénicité. En électrophorèse sur gel de polyacrylamide en sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) en condition réductrice et non réductrice, la fraction d'albumine présente des composés majeurs de Mr = 94 kD, Mr = 86 kD et Mr = 32 kD. L'albumine de Mr = 24 kD disparaît après réduction. D'autre part, la fraction de globulines est représentée par la viciline 7S (Vignine), qui est une protéine hétérogène avec une masse moléculaire de 170 kDa. Cette dernière est fortement liée à la chitine, chitosane et la chitine acétylée, lui conférant la propriété de se lier aux structures fongiques, ce qui interfère avec le processus de germination des spores ou des conidies de champignons. Les globulines du haricot niébé sont composées de 3 fractions majeures : α -vignine, β -vignine, γ -vignine. La viciline α -vignine est une protéine non glycosylée de 16.5 S. Elle est composée d'une sous-unité de 80 kDa qui après réduction en SDS-PAGE donne deux fragments protéiques de 20 kDa et 60 kDa. La fraction β -vignine correspond à une protéine glycosylée de 13 S composée de deux fragments de 55 kDa et 60 kDa. La γ -vignine est composée d'un seul polypeptide de 22 kDa. Le profil en acides aminés du haricot niébé se caractérise par sa riche en lysine, leucine, arginine et autres acides aminés essentiels, répondant largement aux besoins en acides aminés essentiels d'un régime humain. Cependant il est faible en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) par rapport aux céréales et aux produits d'origine animale, nécessitant ainsi un complément avec ces sources pour un régime (73,74).

III.4.3. Lipides et Acides gras

La teneur en lipides des graines de niébé varie de 0,5 % à 3,9 %. Le profil lipidique est caractérisé par une prédominance des triglycérides (41,2 % de la matière grasse totale), suivis des phospholipides (25,1 %), des monoglycérides (10,6 %), des acides gras libres (7,9 %), des diglycérides (7,8 %), des stérols (5,5 %) et des hydrocarbures et esters de stérols (2,6 %). Le haricot niébé est riche en acides gras linoléique et palmitique, suivis de l'acide oléique, de l'acide stéarique et de l'acide alpha linoléique **(75,76)**.

III.4.4. Minéraux

le haricot niébé constitue une source de minéraux essentiels, tels que le calcium, le magnésium, le potassium, le fer, le zinc et le phosphore. Le teneur en minéraux varie en fonction des conditions environnementales **(77)**. La plupart des minéraux se trouvent en concentrations plus élevées dans les feuilles et les gousses vertes immatures par rapport aux graines. Le processus de décorticage des graines peut occasionner une perte de certains minéraux **(77-79)**.

III.4.5. Vitamines

Les haricots niébé sont une source de thiamine et de niacine, et contiennent également des quantités raisonnables d'autres vitamines hydrosolubles comme la riboflavine. Les tissus végétatifs, y compris les graines germées, ont généralement des niveaux plus élevés de niacine, de thiamine et de riboflavine **(75)**. L'élimination de la peau de la graine peut entraîner une perte de jusqu'à 30 % de la teneur en niacine, tandis que la cuisson réduit la thiamine de 41 % **(80)**. Les valeurs de vitamine C sont plus élevées dans les feuilles que dans les graines et peuvent augmenter de 4 à 38 fois après la germination des graines **(81)**.

III.5. Les composés anti-nutritifs

III.5.1. Les oligosaccharides

Le stachyose, le raffinose et le verbascose sont des oligosaccharides indigestibles par l'organisme. Ils constituent un substrat pour la flore intestinale et sont métabolisés par un processus de fermentation. Pour certaines personnes, ceci provoque des ballonnements, des flatulences, et des inconforts intestinaux et

constitue une contrainte à la consommation de haricot niébé. Cette réaction n'est pas systématique, sa survenue et son intensité peuvent varier selon le sexe, l'âge, la composition de la flore intestinale et d'autres facteurs (83, 84). La concentration d'oligosaccharides dans les graines de haricot niébé varie. Des méthodes comme le décorticage, le trempage, la germination et la cuisson peuvent réduire la teneur en oligosaccharides (85-88).

III.5.2. Acide Phytique

La majeure partie du phosphore est présente sous forme d'acide phytique (89). Ce dernier peut réduire la biodisponibilité des minéraux et la digestibilité des protéines et des amidons en inhibant les enzymes digestifs tels que les protéases et les amylases (89,90). Son taux diffère entre les variétés et peut être réduit par le séchage, le stockage, le décorticage, le trempage, la germination, la fermentation, la cuisson ou la torréfaction (91).

III.5.3. Polyphénols

Les polyphénols sont de puissants antioxydants et sont principalement présents dans le tégument des graines du haricot niébé. La teneur des polyphénols diffère en fonction de la variété de niébé et en fonction des traitements que subit la graine avant la consommation. En effet, la cuisson et le décorticage réduisent leur teneur. La germination quant à elle permet de l'augmenter. Ces composés, bien que bénéfiques pour les défenses antioxydantes de l'organisme, sont source d'indigestion pour les protéines et l'amidon. (90), et leur concentration diffère parmi les variétés de niébé (85).

III.5.4. Inhibiteurs de protéases et lectines

Les inhibiteurs de protéases et les lectines sont considérés comme l'un des facteurs antinutritionnels les plus importants dans le niébé (92). Les inhibiteurs de protéases et lectines sont inactivés au cours de cuisson. Les lectines, des glycoprotéines impactent négativement l'absorption des nutriments (93).

III.5.5. Les allergènes

Les réactions allergiques aux légumineuses sont relativement courantes (3), mais elles sont rares pour le haricot niébé. Le seul cas de réactivité clinique au niébé est rapporté par Rao et al, 6 patients ont réagi positivement aux protéines du haricot niébé (94).

III.6. Aptitudes physico-chimiques à la panification et valorisation de la farine du haricot niébé

Les principales caractéristiques d'une farine sont : l'indice gonflement G, la teneur en eau, la force boulangère (W), le taux de cendres. L'ensemble de ces caractéristiques permet d'appréhender l'orientation de la farine vers la fabrication de pain, de biscuits ou autres produits alimentaires. L'indice de gonflement d'une farine est la capacité de l'amidon à absorber l'eau et à gonfler lorsqu'il est chauffé. Il détermine le comportement de l'amidon pendant le processus de cuisson et indique dans quelle mesure les granules d'amidon se dilatent et absorbent l'eau sous l'effet de la chaleur. La teneur en cendres est utilisée comme indicateur de la qualité de la farine. Une teneur en cendres élevée indique que la farine est riche en fibres. Ce type de farine est idéal pour la fabrication du pain entier. D'un autre côté, une farine hautement raffinée aura une teneur en cendres très faible, elle est idéale pour la pâtisserie. (95). Une force boulangère élevée montre que la pâte obtenue de la farine retient les gaz produits par la levure pendant la fermentation, et donne une meilleure levée de pain et une mie plus aérée. À l'inverse, une farine avec une faible force boulangère donne un pain plat et dense. La force boulangère dépend de la teneur en protéines et en particulier de la teneur en glutenines par rapport aux gliadines. Les farines sans gluten ne contiennent pas de gliadines et de glutenines. Il est possible d'obtenir des résultats satisfaisants dans la panification des farines sans gluten en utilisant la farine de riz qui de par de sa texture légère, peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres farines sans gluten. Il est également possible d'utiliser la farine de maïs qui peut apporter une saveur distincte et une texture granuleuse aux produits de boulangerie et la farine de quinoa qui est riche en protéines et en nutriments avec une texture légère et un goût de noisette. De différentes combinaisons de farines issues de céréales et de légumineuses peuvent être constituées pour la fabrication du pain. Il est

nécessaire d'ajouter des agents liants tels que la gomme de xanthane pour compenser le manque de gluten. Ces agents aident à retenir l'eau et à améliorer la structure du pain **(96)**. Le haricot niébé est valorisé dans plusieurs domaines. Notamment, le domaine des farines composées et celui de l'enrichissement des aliments traditionnels. De nombreuses études montrent que la farine de haricot niébé peut être incorporée dans certains types de produits alimentaires qui manquent de lysine **(97,98)**. L'akara, également appelé koose ou ata (beignets en forme de boules frites à grande profondeur), est une collation ou un petit-déjeuner à base de haricot niébé largement consommé au Nigéria, au Niger, au Ghana et dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest. Les cotylédons décortiqués et complètement hydratés sont broyés manuellement pour obtenir une pâte. L'ajoute de la farine de haricot niébé à des recettes de beignets à la pâte à gâteau augmente la densité et l'intensité de la couleur des beignets. Elle augmente l'absorption de matière grasse et diminue légèrement les scores sensoriels. La qualité nutritionnelle et sensorielle optimale des nouilles chinoises, des muffins et des tortillas est obtenue en utilisant des mélanges de farine de blé, de haricot niébé et d'arachide. L'ajout de la farine de haricot niébé réduit la viscosité maximale et le temps de gélatinisation. Le volume de pain et l'acceptabilité sensorielle sont réduits avec plus de 15 % de farine de haricot niébé, tandis que l'ajout de 5 % de farine de haricot niébé améliore significativement le volume de pain et son acceptabilité sensorielle. La qualité produite de panification est acceptable jusqu'à 15 % avec de la farine de haricot niébé **(95)**.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE IV : MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV.1. Matériels biologiques

Les graines du haricot niébé sont finement broyées à l'aide d'un broyeur à billes (MM400, Retsch). La farine obtenue est stockée à 6°C. Les sérums sanguins sont fournis par l'Unité d'Immuno-Allergologie du centre hospitalier du Luxembourg-Kannerklinik (CHL). Des sérums sanguins de 27 patients allergiques sont utilisés. La caractérisation des sérums est approuvée par le Comité National d'Ethique de la Recherche (20180705). Elle est réalisée selon les normes de la déclaration d'Helsinki. Ces patients allergiques aux légumineuses sont retenus afin de déterminer les profils de sensibilisation à plusieurs légumineuses et d'évaluer une éventuelle réactivité croisée entre certaines sources alimentaires d'allergènes. Les patients sont divisés en deux sous-groupes selon les antécédents cliniques. Dans le groupe L, 14 patients allergiques aux légumineuses, mais tolérants à l'arachide, sont inclus. Dans le groupe LP sont inclus 13 patients allergiques aux légumineuses et à l'arachide. Beaucoup de ces allergies aux légumineuses sont liées au pois et aux lentilles (6 patients), soja (2 patients) et 1 patient au haricot mungo, au lupin et au fenugrec. Les résultats des tests cutanés et de dosage des Immunoglobulines de type E spécifiques (IgEs) mesurés par ImmunoCap (thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden) sont considérés comme positifs lorsque le diamètre de la papule réactionnelle est ≥ 3 mm et les taux des IgEs sont $\geq 0,35$ kUA/l.

IV.2. Identification des protéines allergènes du haricot niébé *Vigna unguiculata* L. Walp

IV.2.1 Extraction des protéines du haricot niébé

Les protéines du haricot niébé sont solubilisées dans un tampon salin à base de phosphate (Sigma, PBS based saline buffer). 1 g de farine est mis en suspension dans 15 ml de tampon. Le mélange est agité à 4°C pendant 2 h (Onilab MS-H-Prot). La suspension est centrifugée à 5000 g (SIGMA 1-16K) pendant 15 min à 4°C. Le surnageant récupéré est centrifugé à 20000 g à 4°C pendant 15 min (THERMO SCIENTIFIC HERAEUS BIOFUGE FRESCO, HOFOS, C15-112) pour éliminer les substances insolubles. L'extrait protéique est délipidé à l'acétone (Sigma-Aldrich, Saint louis, USA, MO) (acétone : extrait protéique (4 :1)) pendant une nuit à -20°C. Après centrifugation à 2000g à 4°C pendant 15 min (THERMO SCIENTIFIC

HERAEUS BIOFUGE FRESCO, HOFOS, C15-112), le culot obtenu est solubilisé dans l'urée 8M contenant 2% de 3-((3 Cholamidopropyl) - diméthylammonio)-1-propane sulphate (CHAPS) (Sigma-Aldrich, Saint louis, USA, MO). Une fraction enrichie en viciline de haricot niébé est préparée selon le protocole **de Souza Ferreira et al (99)**. Il est réalisé des précipitations successives au chlorure de sodium. Les protéines sont extraites avec une solution de NaCl 0.1 M de pH 7.5 (1 :20) (Sigma-Aldrich, Saint louis, USA, MO). Après agitation pendant 1 h à température ambiante et centrifugation à 10 000 g pendant 40 min, une première précipitation des protéines est réalisée à pH 5 sous agitation pendant une nuit à 4 °C. Le culot obtenu après centrifugation à 10 000g pendant 40min est traité avec une solution de chlorure de sodium (NaCl 0.1 M, pH 7.4 à 4°C). La suspension est agitée et centrifugée dans les conditions décrites ci-dessus. Le surnageant est soumis à une seconde précipitation dans les mêmes conditions afin d'obtenir une fraction de viciline isolée dans le culot. Cette fraction est solubilisée par une solution composée de CHAPS 2% et d'urée 8M (Sigma-Aldrich, Saint louis, USA, MO).

IV.2.2. Électrophorèse monodimensionnelle et immunotransfert

L'électrophorèse monodimensionnel (1D) est faite en conditions dénaturantes en utilisant des gels anyKD précoulés contenant 10 puits (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, BIO-RAD) sur un appareil PROTEAN TetraCell (Bio-Rad, Temse, Belgique). Des protéines de Masses moléculaires (Mr) variant de 6.5 à 200 kDa (BIO-RAD) sont utilisées comme marqueurs de taille et 30 µg d'extraits protéiques sont mis à migrer. Après 50min de migration à 300 volts et 200 mA, les gels sont colorés au SYPRO Ruby (Invitrogen, ThermoFischer). Le transfert sur membrane PVDF est effectué selon les étapes suivantes : les gels de polyacrylamide contenant les protéines séparées sont d'abord mis à équilibrer dans le tampon de transfert composé de Tris base, Glycine et Méthanol. Trois cycles de lavage sont effectués. Durant chaque cycle, les gels sont agités pendant 5 min dans un bac contenant le tampon de transfert. En même temps, il est effectué l'activation des membranes PVDF (polyvinylidene difluoride) (Sigma-Aldrich) avec du méthanol pendant 15 secondes, puis avec le tampon de transfert pendant 5min. Un assemblage comprenant le gel, la membrane PVDF, le papier Whatman qui est préalablement hydraté avec le tampon de transfert

est réalisé puis placé dans l'appareil de transfert (Powerpac HC). Le transfert est réalisé à 14V, 0.9 A pendant 50 min. À la fin du transfert, les membranes (PVDF) (Sigma-Aldrich) sont récupérées puis bloquées avec le Sérum Albumine Bovine (SBA 3%) (Sigma-Aldrich) dans une solution saline tamponnée aux Tris (Sigma-Aldrich) contenant 0.05% de Tween 20 (Tris Buffered Saline with Tween- TBST) pendant 2 h à température ambiante. Après lavage au TBST, les membranes sont incubées durant une nuit à 4°C avec les sérums des patients allergiques dilués au 1/10 et au 1/20. Pour la détection des anticorps IgE humains, les membranes sont incubées pendant 2 h avec un anticorps monoclonal anti-IgE humain de souris conjugué à la Horseradish Peroxidase (HRP) (Southern Biotech, Anvers, Belgique) suivie d'une étape de lavage et de révélation par chimioluminescence en utilisant le super signal west femto maximum sensitivity substrat kit (Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgique). La visualisation des bandes immunoréactives est réalisée sur un système d'imagerie moléculaire automatique (Typhone Amersham)

IV.2.3. Électrophorèse bidimensionnelle et immunotransfert

La farine du haricot niébé est délipidée à l'aide du 2D-Clean up Kit (GE Healthcare, Cytiva), conformément au protocole du fabricant (GE Healthcare, Cytiva). Brièvement, 1-500 µg de protéines de haricot niébé qui correspondent à un volume de 100 ml sont transférées dans un tube de centrifugation de 1.5 ml. 600 µl de l'agent de précipitation et 600 µl d'agent de co-précipitation sont ajoutés et bien mélangés à l'aide d'un vortex (VELP RX3 Vortex). Deux cycles de centrifugation à 12 000 g (THERMO SCIENTIFIC HERAEUS BIOFUGE FRESCO, HOFOS, C15-112) sont réalisés pendant 5min et 30 secondes respectivement afin d'obtenir un culot protéique. Ce dernier est soumis à deux cycles de lavage en utilisant le réactif de lavage n°1 ainsi que l'eau ultra pure. Un deuxième réactif de lavage est utilisé pour la phase d'incubation. Le culot obtenu par centrifugation dans les mêmes conditions citées précédemment est dispersé dans 2 ml de réactif de lavage n°2 et 10 µl d'additive de lavage. La solution est agitée à l'aide d'un vortex pendant 1 min, puis incubée à -20°C pendant 30min avec agitation à intervalle régulier de 10min. A la fin de cette période, le culot est récupéré par centrifugation à 12000g pendant 5min. Les protéines sont solubilisées dans un tampon de réhydratation de pH 8.8 composé d'urée 8 M et de CHAPS 2%. Les protéines sont marquées par le

colorant Cy5 en suivant les recommandations du fabricant (PRIMETECH, Minsk, Biélorussie). La séparation en Isoélectrofocalisation 1D (IEF-1D) est réalisée en condition native à l'aide du système Protean IEF Cell (Bio-Rad). 50 µg de protéines marquées au Cy5 sont incubées avec les bandelettes de gel polyacrylamide (Strips à Gradient de pH Immobilisé, Immobilized pH Gradient strips- IPG) de 7cm et de pH 3-10 dans un tampon de réhydratation composé d'urée 8M, Chaps 5%, Dithiothreitol (DTT) (Sigma) et Bio-lytes 0.2%. Les strips sont placés dans un sarcophage approprié et sont couverts d'huile de paraffine pour éviter toute déshydratation durant une nuit afin que les protéines pénètrent dans le gel par diffusion passive. L'Isoélectrofocalisation est réalisée selon les conditions suivantes : la migration s'effectue à 20°C: le Voltage initial : 0 V, le Voltage final : 4000 V et le voltage par heure est de 8 – 10 000 Volt/heure. Une phase d'équilibration des strips est réalisée en 2 étapes. Les strips sont mis à équilibrer pendant 15min dans 10 ml de tampon d'équilibration réducteur formés de Tris-HCl, pH 8.8, 2M 50mM, Urée (FW 60.06) 6M, Glycérol (87% v/v) 30% (v/v), SDS (FW 288.38) 2% (w/v), DTT 10 mM. Ce tampon permet de rompre les structures tridimensionnelles et secondaires des protéines incubées dans le gel et en particulier les ponts disulfures intra et interprotéiques. Le second tampon d'équilibration est un tampon d'alkylation, renfermant 10% d'Iodoacétamide (Iodoacétamide 55mM dans NH₄HCO₃ 100mM (Sigma)) est incubé avec les strips pendant 15min afin d'empêcher la reformation des ponts disulfures. Les gels de polyacrylamide préfabriqués kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ (Biorad) sont utilisés pour la deuxième dimension. Trois strips sont transférés sur gel de polyacrylamide de gradient de concentration de 10%. Des marqueurs de masses moléculaires (Mr) variant de 6.5 à 200 kDa (Bio-Rad 161-0317) migrent en parallèle avec les protéines séparées dans un système d'électrophorèse monodimensionnelle mini Protean electrophoresis cells (Biorad Powerpac Hc). La migration est menée à 100 mA pendant 1h45 min dans un tampon de migration composé de TRIS 0,25 M, Glycine 1,92 M, SDS 1 % et eau distillée. À la fin de la migration, un gel est récupéré et coloré au Sypro ruby (Invitrogen™) tandis que les deux autres sont utilisés pour l'immunotransfert IgE sur membrane PVDF dans les conditions décrites ci-dessus. La visualisation des gels est réalisée à l'aide d'un système d'imagerie moléculaire automatique (Typhone Amersham).

IV.2.4. Analyse des protéines allergènes par spectrométrie de masse

En mode manuel, sous lumière bleue, chaque spot correspondant à un composé protéique immunoréactif est découpé en un petit morceau de gel (1 mm x 1 mm) et placé dans un tube de centrifugation de 0.5 ml. Les protéines excisées du gel sont lavées pendant 10min dans 50 µl d'eau ultra-pure. Ils sont ensuite équilibrés avec 20 µl de NH_4HCO_3 et 50 mM (Sigma) pendant 10min. Après élimination du tampon, il est ajouté en excès de l'acétonitrile (Sigma) afin de déshydrater les gels. La déshydratation est réalisée pendant 10 min. Après élimination de l'acétonitrile, il est ajouté du NH_4HCO_3 , 50 mM afin de réhydrater les particules de gel. Ces deux étapes sont répétées une seconde fois. À la fin de cette opération, les gels sont séchés à l'air libre. Ensuite, les protéines sont réduites dans 100 µl de tampon dithiothréitol (DTT 10 mM/ NH_4CO_3 50mM) (Sigma) puis alkylées dans 100µl de tampon iodoacétamide (IAA 50 mM/ NH_4CO_3 50 mM) (Sigma). La digestion des protéines allergènes est réalisée à l'aide de la trypsine 6.25 µg/µl (Sigma) dans NH_4CO_3 50mM. La réaction enzymatique est réalisée à 37°C pendant 4 h. La trypsine clive spécifiquement les liaisons peptidiques dont les groupes carboxyles sont fournis par l'arginine et lysine sauf s'il existe une proline adjacente. L'ajout de 20 µl d'acide trifluoroacétique 0.1% et agitation puis sonification de la solution pendant 5min permet d'arrêter la réaction enzymatique. Le surnageant est prélevé et conservé dans un tube. Le culot obtenu est repris dans 20 µl d'acide trifluoroacétique 0.1 %. Le tout est agité pendant 15 min à 37°C. Le surnageant est à nouveau prélevé et ajouté au précédent. L'opération est répétée avec 20µl d'acétonitrile 100%. La totalité des surnageants récoltés est totalement séchée. Après l'addition de 20µl d'acide trifluoroacétique 1% et une étape de sonification, les peptides sont conservés à -80°C jusqu'à l'analyse par spectrométrie de masse MALDI TOF TOF (Ultraflex I, Bruker, Allemagne). Les peptides issus de la digestion trypsique sont directement déposés dans les spots d'une plaque cible MALDI (plaque inerte en acier poli 384, Bruker, Allemagne). 0,3 µl de la solution de matrice formée de 5 mg/ml d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, HCCA, Bruker et 1 mg /mL d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), Bruker dans 50 % d'ACN contenant 0,1 % de TFA sont ajoutés dans chaque spot selon la méthode des gouttelettes séchées (instructions du fabricant de Bruker). Les protéines sont identifiées par des empreintes peptidiques

de masse (PMF). La liste de masse obtenue est utilisée pour la requête (Biotoool 3.0) dans le sous-ensemble *Viridipantae* (Green Plants) (155528436 séquences) de la base de données Plant_EST (165622902 séquences ; 29491002258 résidus), avec les paramètres suivants : état de charge de +1, tolérance de masse de 120 ppm, tolérance à 3 clivages manqués, oxydation potentielle de la cystéine par la carbamidométhylation de la méthionine et seuil MASCOT de 5 %.

IV.2.5. Recherche des protéines allergènes dans les bases de données

La recherche Blast (protéine-protéine) des deux premiers résultats Mascot suivis d'une digestion in silico et d'une comparaison avec la liste de masse spectrale avec Biotoool Mass Editor (Bruker, Allemagne) consolide l'identification des protéines. Les recherches dans la base de données sont effectuées avec une tolérance de 2 clivages manqués dans le sous-ensemble *Viridiplantae* (plantes vertes) (155528436 séquences) de la base de données Plant_EST (165622902 séquences ; 29491002258 résidus), la tolérance de masse pour les ions précurseurs est fixée à 0,5 Da et 0,8 Da pour les ions fragments et le score de coupure est fixé au seuil MASCOT par défaut de 5 %. L'analyse de la séquence des protéines est effectuée sur l'outil de recherche d'alignement local de base des protéines (BLASTp), l'outil d'alignement multiple basé sur les contraintes (COBALT) et la recherche FASTA complète dans Allermatch, version 36.3.8h mai 2020) en utilisant les paramètres par défaut.

IV.2.6 Détermination des réactivités croisées entre le haricot niébé et le pois vert et entre le haricot niébé et l'arachide

Le pois vert et l'arachide sont choisis afin d'évaluer le potentiel d'allergie croisée au haricot niébé en raison des profils cliniques des patients. En effet, l'allergie et la sensibilité à ces deux légumineuses sont très fréquentes dans la cohorte des patients retenus pour l'étude. De plus, ces deux légumineuses contiennent des protéines homologues aux protéines contenues dans le haricot niébé, notamment la viciline avec laquelle elles partagent plus 50% d'identité. La technique de micro-titration sur plaque à 96 puits ELIZA- (Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) est employée pour mesurer les IgEs des protéines du

haricot niébé. Cette plaque est enduite d'extrait protéique de haricot niébé ou d'une fraction de viciline enrichie à 5 µg/ml pendant une nuit. Les sites de fixation libres sont bloqués à l'aide de BSA 3% dilué dans du TBST 0.05 %. Les sérums des patients sont dilués dans un tampon de blocage (BSA 3%, TBST 0.05%) à 1 : 5 et 1 : 10 puis incubés à 4°C pendant une nuit. Les sérums sains de 3 adultes sont utilisés comme témoins négatifs. Les IgE humaines liées sont détectées par incubation avec des anticorps monoclonaux anti-IgE humains marqués à la biotine (Southern Biotechnology) suivie de streptavidine-AP (BD Pharmingen). Après développement de la couleur avec du para-NitroPhényl Phosphate-pNPP (Sigma), l'absorbance est lue à $\lambda=405$ nm. Il est utilisé des dilutions en série du sérum d'un patient allergique aux chats avec un niveau connu d'IgEs contre l'albumine sérique de chat Fel d 2, déterminée par ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific, Uppsala, Suède) pour tracer une courbe standard (Annexe N° 1). Ce sérum est introduit dans des puits recouverts de Fel d 2. De la gélatine de poisson d'eau froide (Sigma, Overijse, Belgique) est utilisée comme agent bloquant. Elle est diluée à 2 % dans du TBST 0,05 %. Une courbe standard tracée permet de convertir les unités de Densité Optique (DO) en dilutions d'IgE spécifiques. Des niveaux inconnus d'IgEs aux allergènes du haricot niébé sont calculés. Les valeurs inférieures à 0,35 kUA/L sont considérées comme négatives. Les tests d'inhibition ELISA sont effectués sur l'arachide et le pois vert comme décrit ci-dessus. 100µl d'extrait protéique de chaque légumineuse sont solubilisés (5 ug/ml sur la plaque). Les inhibitions sont réalisées en incubant d'abord des sérums de patients dilués dans 200 µg d'extraits de pois, d'arachide, de haricot niébé et d'une fraction de haricot niébé enrichie en viciline pendant 2h à température ambiante avant de les introduire dans les puits. L'inhibition est considérée comme pertinente lorsque l'inhibition des IgE est supérieure à 10 %.

IV.2.7. Évaluation de la réactivité des patients vis-à-vis des allergènes par le test d'activation des basophiles

L'activation in vitro des basophiles est réalisée à l'aide du kit Flow CAST (BUHLMANN Laboratories AG, Bâle, Suisse). Treize tests sont effectués. Le tampon PBS est utilisé pour l'extraction des protéines solubles à partir du pois vert, de l'arachide, du haricot niébé, de la lentille, du soja et du haricot mungo comme décrit précédemment. Le sang des patients est collecté dans des tubes de 10 ml contenant l'EDTA. L'analyse ne doit pas dépasser 24 heures après la collecte. Pour chaque sujet et allergène, des tubes en polystyrène renfermant 50 µl d'extrait protéique de légumineuse de concentration allant de 0.001 µg/ml à 1000 µg/ml est dilués dans 100 µl de tampon de stimulation (contenant de l'héparine, CaCl₂ et de l'IL-3 (2ng/ml)). Les cellules sont stimulées et colorées selon les instructions du fabricant. Brièvement, à 50 µl de sang avec de l'EDTA sont ajoutés 20 µl d'agent de coloration composé d'anticorps anti-CCR3-PE (anticorps monoclonaux marqués par fluorescence pour la sélection des basophiles) et des anticorps anti-CD63-FITC (anticorps permettant de déterminer l'état d'activation des basophiles selon l'expression des marqueurs d'activation CD63). La solution est homogénéisée et incubée à 37°C pendant 25 min dans un bain-marie (LAUDA Eco E10). Après ajout de 2 ml de tampon de lyse (BUHLMANN Laboratories AG, Bâle, Suisse), le tout est incubé à 28°C pendant 5 à 10min. Ensuite, le tube est centrifugé à 500 g pendant 5min puis le surnageant est décanté. Le culot est repris dans 300 µl de tampon de lavage contenant du formaldéhyde 0.1% (un agent de fixation) puis soumis à une agitation douce dans un vortex. Des anticorps spécifiques mAb anti-FcεRI (anticorps monoclonal spécifique aux récepteurs de haute affinité pour l'IgE), et du N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) sont utilisés comme témoins positifs. Les valeurs de fond sont évaluées avec 50 µl de tampon de stimulation. Les cellules sont analysées à l'aide de cytomètre en flux LSR Fortessa (Becton Dickinson Immunocytometry System; Becton Dickinson, Heidelberg, Allemagne) avec le logiciel BD CellQuest ou BD FACSDiva. La régulation à la hausse du marqueur d'activation des basophiles CD63 est calculée sur la base du pourcentage de cellules CD63+ par rapport au nombre total de basophiles identifié. Un seuil positif de 15 % de cellules CD63+ est utilisé. Les patients ayant une faible réactivité (<10% de cellules CD63 positives) au fMLP et à l'anti-FcεRI sont considérés comme non-

répondeurs. Les basophiles sont incubés avec des protéines de différentes légumineuses de concentrations croissantes. Le nombre relatif de cellules de basophiles CD63+ est déterminé par cytométrie en flux. *p < .05, **p < .01, ***p < .001 et ****p < .0001 pour la comparaison entre les groupes à l'aide du test de comparaisons multiples de Holm-Sidak ANOVA).

IV.3. Détermination de la composition biochimique du haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp*

IV.3.1. Détermination de la teneur en amidon total

Une solution stock est préparée en dispersant 0.5g d'amidon dans 20 ml d'eau distillée. Au mélange obtenu, il est ajouté 80 ml d'eau bouillante. Après refroidissement, la solution d'amidon est ajustée à 100 ml avec de l'eau distillée. À partir de la solution stock d'amidon (solution mère) à 5 mg/ml, il est prélevé des volumes croissants allant de 0.01 à 0.1 ml. Dans chaque tube, il est introduit 0.1 ml de réactif d'iode (Sigma). Le volume est ajusté à 5 ml avec de l'eau distillée. L'absorbance est déterminée à $\lambda = 580$ nm (3 mesures) pour l'amylose + amylopectine ; $\lambda = 720$ nm (3 mesures) pour l'amylose. Les annexes N° 2 et N° 3 montrent les courbes d'étalonnage de la concentration d'amidon (l'amylose + amylopectine) et d'amylose (mg/ml) en fonction de la Densité Optique (DO). Pour le calcul du taux d'amidon total et de l'amylose dans la farine de haricot niébé, il est pesé 0.1g de farine, à laquelle est ajouté 5 ml de KOH 1N (Sigma). Après homogénéisation, neutralisation avec 5 ml de HCl 1N (Sigma), ébullition au bain-marie pendant 15min, réajustement du volume à 10 ml et centrifugation à 4000 g pendant 5min, le surnageant est récupéré pour le dosage. À 0.05 ml de surnageant de chaque échantillon, 4.85 ml d'eau distillée et 0.1 ml de réactif d'iode sont ajoutés. Ensuite, le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min et les Absorbances (D.O) sont mesurées à 580nm et 720nm.

IV.3.2. Détermination de la teneur en cellulose brute

La teneur en cellulose brute est déterminée par hydrolyse alcaline et acide. L'hydrolyse acide est réalisée à chaud. Il est dispersé 1g de haricot niébé finement broyé dans 150 ml H₂SO₄ à 1.25% (Sigma). Le résidu

obtenu est filtré puis lavé à l'eau chaude. L'hydrolyse alcaline est réalisée à chaud, 1 g de haricot niébé finement broyé est dispersé dans 150 ml de NaOH à 1.25%. Après lavage à l'acétone, étuvage pendant 8h à 105°C et une calcination de 2h à 550°C dans un four à moufle (**100**). Les teneurs en cellulose brute sont déterminées selon la formule suivante :

$$CB = \frac{M' - M''}{M'} \times 100$$

M': Masse de la cellulose brute sèche avant calcination (g).

M'' : Masse des cendres de la cellulose brute après calcination (g).

CB : Teneur de cellulose brute (%).

IV.3.3. Détermination de la teneur en lignine totale

Un gramme de haricot niébé finement broyé est dispersé dans 15 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ 72 % puis placé dans une bouteille en verre de 250 ml au fond de laquelle se trouve deux billes en verre. Après agitation pendant 2 h, de l'eau distillée y est ajoutée afin de réaliser une hydrolyse à l'acide sulfurique H₂SO₄ 3%. La bouteille est refermée et portée à reflux pendant 6 h pour extraire la lignine à partir de la cellulose. Ensuite, la solution est laissée au repos pendant une nuit, puis filtrée sur verre fritté. Le premier filtrat est récupéré dans un bécher de 50 ml. Plusieurs lavages à l'eau sont effectués pour éliminer la cellulose. Les frittés sont placés dans un four réglé à 105°C pendant une nuit puis pesés. En parallèle, une dilution 1/10 du filtrat récupéré est réalisée. 2 ml de ce filtrat est prélevé et placé dans un bécher de 25 ml. Il y est ajouté 18 ml d'eau distillée. La lignine soluble est déterminée par spectrophotométrie à $\lambda=205\text{nm}$. Trois mesures d'absorbance successives sont réalisées pour chaque échantillon.

IV.3.4. Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines totales est déterminée par la méthode de Kjeldhal (%N x 6,25). 0,1g de haricot niébé finement broyé est placé dans le ballon de l'appareil Kjeldhal. Il y est ajouté 10g de sulfate de potassium K_2SO_4 , 1,2g d'un catalyseur chimique à base de sulfate de Cuivre $CuSO_4$, 25 ml d'acide sulfurique H_2SO_4 96% et une petite quantité de granules de pierre de ponce. Le ballon est chauffé avec modération, en appliquant une agitation de temps en temps jusqu'à carbonisation de la masse et disparition de l'écume ; puis plus intensément jusqu'à ébullition. La minéralisation est arrêtée 1 h après l'apparition d'une solution limpide (vert claire). Après refroidissement, 350 ml d'eau distillée sont additionnés avec précaution en agitant afin de solubiliser les sulfates. Pour la distillation, 25 ml d'acide sulfurique H_2SO_4 0,1 N est quelques gouttes de rouge de méthyle (indicateur coloré) sont introduits dans le flacon collecteur de l'appareil. Ce dernier est lié au réfrigérant du distillateur. Après connexion du ballon au réfrigérant de l'appareil à distiller, 100 ml d'hydroxyde de sodium NaOH 40% et 25 ml de thiosulfate de sodium $Na_2S_2O_3$ 0,1 N sont introduits dans le ballon par l'entonnoir à robinet. Le ballon est alors chauffé afin de récupérer 150 ml de distillat au bout de 30 minutes. L'excès d'acide sulfurique est titré à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium NaOH 0,1N dans le flacon collecteur jusqu'au virage de la coloration au jaune clair. La teneur en protéines totales est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en protéines totales (\%)} = A \times B \times M_N \times 100 \times f/m$$

Où :

- A = Volume de H_2SO_4 (ml) nécessaire à la titration de NaOH
- 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 de l'azote protéique en équivalent de masse de protéines. $f=6,25$.

IV.3.5. Fractionnement sélectif des protéines

Dans un bécher de 500 ml, 50 g de haricot niébé finement broyés sont dispersés dans 300 ml d'eau distillée. Après 20 h d'agitation à 300 t/min sur un agitateur magnétique (STUART UC152) à température ambiante et centrifugation à 3000 t/min pendant 30min, le surnageant est récupéré dans une fiole jaugée de 1000 ml. Le culot est soumis à 4 extractions successives de protéines hydrosolubles dans 150ml d'eau distillée pendant 2h dans les mêmes conditions que précédemment. La Densité Optique (D.O) de chaque extrait est mesurée à $\lambda=280$ nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-visible, UV line 9400 secoman, France) afin de constater l'extraction de la totalité des protéines hydrosolubles. Le culot est repris par 300 ml de NaCl 0.5 M. Le mélange est agité et centrifugé comme décrit dans la méthode d'extraction des protéines hydrosolubles. Le surnageant est récupéré dans une fiole jaugée de 1000 ml. Après avoir soumis le résidu à 4 extractions de protéines salino-solubles avec 150 ml de NaCl 0.5 M (agitation à 300 t/min pendant 1h et centrifugation à 3000 t/min), la Densité Optique est lue à $\lambda=280$ nm. Les parties liquides obtenues sont ajoutées à la première. Le niveau des 2 solutions protéiques est soigneusement ajusté au trait de jauge des fioles à 1000 ml. Le résidu est placé dans un bécher de 250 ml. Il est dispersé dans 75 cm³ d'éthanol 70% (C₂H₅OH 70%). Le tout est agité à 300 t/min sur un agitateur magnétique (STUART UC152) pendant 2h puis centrifugé à 3000 t/min pendant 30 min. Le surnageant est récupéré puis introduit dans une fiole jaugée de 200 ml. Le résidu est traité comme décrit ci-dessus. Le deuxième surnageant est ajouté au premier. Le niveau de la solution protéique est ajusté avec de l'éthanol (C₂H₅OH 70%) jusqu'au trait de jauge 200ml de la fiole. 100 ml de cette solution protéique sont dialysés contre de l'eau distillée à 4°C pendant 24 h afin de récupérer les protéines solubles dans C₂H₅OH 70% par centrifugation à 3000 t/min pendant 15 min. Au culot, il est ajouté 50 ml d'acide acétique CH₃COOH 0.05 N. Le mélange est centrifugé à 3000 t/min pendant 2h. Le surnageant est introduit dans une fiole jaugée de 100 ml. Le culot est repris dans 50 ml de CH₃COOH 0.05 N et traité de la même façon que précédemment. Le deuxième surnageant est ajouté au premier. Ensuite, le niveau de la solution protéique est ajusté à 100 ml avec CH₃COOH 0.05 N. le dernier résidu est séché dans une étuve réglée à 80°C pendant 3h puis pesé. La teneur en protéines de chaque fraction protéique du

haricot niébé (protéines hydrosolubles, protéines salino-solubles (NaCl 0.5M), protéines solubles dans l'éthanol C₂H₅OH 70% et dans l'acide acétique CH₃COOH 0.05N, protéines insolubles) est déterminée par la méthode de Kjeldhal.

IV.3.6. Détermination de la teneur en lipides totaux

L'extraction des lipides totaux est réalisée à chaud dans un extracteur de type soxhlet pendant 8h. 20 g de haricot niébé finement broyés sont placés dans une cartouche en cellulose. Cette dernière est introduite dans le soxhlet. La délipidation est réalisée avec 1.5 l d'éther de pétrole. Quand le solvant contenu dans le ballon de l'appareil arrive à ébullition (P.E. 35-65°C), les vapeurs passent dans le tube de distillation et pénètrent dans le réfrigérant où elles sont liquéfiées. Le condensat coule sur la cartouche et s'accumule dans le soxhlet. Une fois que le solvant (éther de pétrole-lipide) atteint le niveau du tube-siphon, il passe dans le ballon. À la fin du processus, l'éther de pétrole est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif pour obtenir les lipides. La masse des lipides totaux est calculée comme suit :

$$M = (M_t - M_v)$$

Où :

- **M** : Masse de lipides (g).
- **M_t** : Masse du ballon rempli de lipide (g).
- **M_v** : Masse du ballon vide (g).

Le résultat est exprimé en g de lipides totaux par g de haricot niébé (ISO 659/1998)

IV.3.7. Détermination de la composition en cendres, en microéléments et en oligo-éléments

IV.3.7.1 Détermination de la teneur en cendres

3 ± 0.00002 g de haricot niébé finement broyé sont pesés à l'aide d'une balance de précision, puis placés dans une capsule en porcelaine (3 prises d'essai, et 1 analyse par prise d'essai). Après ajout de quelques ml

d'alcool C₂H₅OH, l'échantillon est carbonisé à 100°C dans une hotte fermée. À la fin de la carbonisation et refroidissement, la capsule et son contenu sont introduits dans un four à moufle froid (Nabertherm LH 15/12). L'incinération est réalisée jusqu'à combustion complète du produit, soit 6h après la montée de la température du four à 550°C. À la fin du processus, la capsule est retirée du four et placée dans un dessiccateur pendant 30 min pour refroidir. Ensuite, l'échantillon est rapidement pesé. L'incinération se poursuit durant 1h comme décrite ci-dessus. Après la pesée, l'expérience est répétée dans les mêmes conditions pour s'assurer que la masse finale reste constante. Le teneur en cendres est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Teneur en cendres \%} = (m_2 - m_1) \times 100 / m_0 \times 100 / 100 - W_m$$

Où :

- **m₀** : Masse de la prise d'essai (g).
- **m₁** : Masse de la capsule d'incinération (g).
- **M₂** : Masse de la capsule d'incinération et du résidu d'incinération (g).
- **W_m** : Teneur en eau (%).

IV.3.7.2. Détermination de la teneur en microéléments et oligo-éléments

Les principaux microéléments et oligo-éléments essentiels à l'organisme humain (ça, Fe, Cu, Zn, Mg, pH) sont déterminés par Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA). Aux cendres contenues dans la capsule en porcelaine est ajouté 3 ml d'acide nitrique 15.77M (Sigma). Le tout est légèrement chauffé sur une plaque chauffante. Le mélange est filtré sur papier wattman n° 542. Le filtrat est recueilli dans une fiole jaugée de 10 ml. Après filtration de l'eau de rinçage de la capsule, le niveau de la solution est soigneusement ajusté au trait de jauge. Ensuite, il est préparé la gamme étalon de chaque oligo-élément pour tracer la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration en oligo-élément (Annexe N° 4, N° 5, N° 6, N° 7, N° 8). Les quantités en microéléments et oligo-éléments sont exprimées en ppm.

IV.4. Détermination des paramètres technologiques des graines du haricot niébé *Vigna unguiculata* L. Walp

IV.4.1. Détermination des dimensions de la graine

Les dimensions de la graine de haricot niébé (longueur, largeur et épaisseur) sont mesurées par un pied à coulisse. Les mesures effectuées concernent un échantillon de 25 graines saines prélevées au hasard dans un lot.

IV.4.2. Détermination de la masse de 100 graines

Il est prélevé au hasard un échantillon à peu près égal à la masse de 100 graines dans un lot. La masse de 100 graines saines est déterminée par comptage manuel et pesage à l'aide d'une balance de précision à 0.01g.

IV.4.3. Test de cuisson et détermination de l'indice de gonflement des graines

Cent graines sont placées dans un bécher contenant 100 ml d'eau. Après 15 min d'ébullition sur une plaque chauffante, il est prélevé 4 graines. Chacune de ces graines est coupée en 2 parties à l'aide d'un couteau à lame afin de vérifier leur cuisson (graines non cuites : présence de taches blanchâtres à l'intérieur des cotylédons qui prouve que la gélatinisation de l'amidon est incomplète. Graines cuites : graines tendres au pincement entre les doigts, car l'amidon est entièrement gélatiné). L'analyse de 4 graines et la vérification de leur cuisson sont répétées chaque 5 min jusqu'à cuisson complète. L'indice de gonflement est déterminé par immersion des graines dans un volume d'eau contenu dans une éprouvette graduée de 100 ml avant et après leur cuisson. Il correspond au rapport de volume des graines cuites sur le volume des graines crues.

IV.4.4. Détermination de la Capacité de fixation d'eau et de la capacité de fixation d'huile des graines

0.5 gramme de haricot niébé finement broyé sont dispersés dans 10 ml d'eau ou d'huile végétale. Le tout est agité au vortex pendant 10 min puis centrifugé à 1000 g pendant 15min. Après élimination du surnageant, le tube à centrifuger est retourné afin de permettre à l'eau ou à l'huile d'être égouttée sur papier absorbant

durant 5 min. Le résidu obtenu est pesé (**101**). La capacité de fixation de l'eau ou de l'huile est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Capacité de fixation d'eau ou d'huile} = (\text{Mr}-\text{Mi}) / \text{Mi}$$

Où :

- **Mr** : Masse du résidu (g).
- **Mi** : Masse initiale de la prise d'essai (g).

IV.5. Mise au point du diagramme technologique de fabrication de la farine du haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp*

IV.5.1. Conditionnement des graines

Les graines du haricot niébé sont triées et nettoyées de leurs impuretés. La teneur en eau des graines est ramenée graduellement à 17% par l'ajout d'eau (ratio 3 : 1) et trempage des graines pendant 6h.

La teneur en eau est calculée selon la formule suivante :

$$V = \frac{M(H_f - H_i)}{100 - H_f}$$

Où :

- **V** : Volume d'eau à ajouter (ml).
- **M** : Masse de la prise d'essai (g).
- **Hf** : Teneur en eau finale (%).
- **Hi** : Teneur en eau initiale (%)

IV.5.2. Décortilage des graines du haricot niébé

Le décortilage consiste à séparer l'amande de l'enveloppe des graines. Le principe de cette séparation repose sur la différence d'élasticité des deux constituants de la graine. Il est réalisé par une décortiqueuse industrielle.

IV.5.3. Séchage des graines de haricot niébé

Des étuves industrielles sont utilisées afin de ramener la teneur en eau des graines à approximativement 10% dans le but de réaliser un broyage dans des conditions optimales. Les graines du haricot niébé sont placées dans une étuve à air circulant réglées à 70°C pendant une durée de 12h. la teneur en eau est calculée selon la formule citée précédemment.

IV.5.4. Broyage des graines du haricot niébé

Une broyeuse mécanique pourvue de cylindres métalliques tournant à une cadence régulière permet l'obtention d'un produit issu du broyage. La broyeuse est formée de deux rouleaux cannelés qui tournent en sens inverse, à des vitesses différentes pour écraser les graines qui passent entre leurs dents. Quatre passages sont effectués.

IV.5.5. Tamisage

Trois tamis de différents diamètres sont utilisés afin de séparer les fractions qui se trouvent dans le produit issu du broyage. En premier, il est isolé un produit (P1) grâce à un tamis possédant des ouvertures de mailles de 0.72 mm. Ensuite, il est séparé la semoule (P2) à l'aide d'un tamis à ouvertures de mailles de 0.36 mm. Enfin, la farine (P3) est obtenue grâce à un tamis de mailles plus fines égal à 0.28 mm. La semoule obtenue est orientée vers un second broyage afin d'extraire le maximum de farine et ainsi améliorer le rendement en farine.

IV.6. Détermination des paramètres technologiques de la farine du haricot niébé *Vigna unguiculata* L. Walp

IV.6.1. Détermination de l'Indice de gonflement de la farine

1g de farine et 20 ml d'eau distillée sont introduits dans un tube à essai. Le tout est agité au vortex pendant 1 min. Le tube est ensuite placé dans un bain-marie (LAUDA Eco E10) réglé à 90°C pendant 30 min. Après

Refroidissement rapide à l'eau pendant 30 s et avec des glaçons durant 10 min, l'échantillon est centrifugé à 4500 g pendant 10min. Le surnageant est éliminé et le culot est pesé. L'indice de gonflement est le rapport entre la masse finale du culot et la masse initiale de l'échantillon (**101, 102**). Il est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Indice de gonflement} = \text{Mf} / \text{Mi}$$

Où :

- **Mf** : Masse finale du culot (g)
- **Mi** : Masse initiale de l'échantillon (g)

IV.6.2. Détermination de la Capacité de fixation d'eau et capacité de fixation d'huile de la farine

La capacité de fixation d'eau et la capacité de fixation d'huile sont réalisées comme décrit précédemment.

IV.6.3. Réalisation des coupages entre la farine du haricot niébé et les farines de maïs et de riz.

Deux coupages sont réalisés en utilisant la farine du haricot niébé et les farines issues de deux céréales (maïs *Zea mays L* et riz *Oryza sativa*) et avec l'ajout de l'amidon de maïs et de féculs de pommes de terre. Les formules proposées par l'entreprise MINY de fabrication des produits sans gluten sont des formules utilisées pour la fabrication de leurs produits. Dans ces formules, la farine de haricot niébé est utilisée en substitution à des farines d'autres légumineuses telles que les lentilles. La formule F1 est une complémententation de céréales légumineuse avec un rapport massique de 2/1. Ce ratio permet l'obtention de farine possédant une valeur nutritionnelle élevée. Pour la formule F2, le ratio 10/1 permet d'obtenir une farine avec une valeur nutritionnelle correcte et des aptitudes technologiques et sensorielles améliorées (**95**). Le tableau N° 5 donne les 2 formulations de farines réalisées.

IV.6.4. Détermination de la composition biochimique de la farine composée des farines du haricot niébé et des farines de maïs et de riz.

La détermination de la teneur en protéines, amidon, lipides, cendres, microéléments (Calcium, Magnésium, Phosphate) et oligo-éléments (Cuivre et zinc) est réalisée comme décrit précédemment. Deux formulations sont proposées de manière empirique.

Tableau N° 5 : Formules des farines issues du haricot niébé et des farines de maïs et de riz

Formule 1 (ratio céréales/ haricot niébé 2/1)	Formule 2 (ratio céréales/ haricot niébé :10/1)
10 kg farine de haricot niébé <i>Vigna unguiculata</i>	3 kg de farine de haricot <i>Vigna unguiculata</i>
10 kg de farine de riz <i>Oryza sativa</i> .	15 kg de farine de riz <i>Oryza sativa</i> .
2 kg de farine de maïs <i>Zea mays L.</i>	2 kg de farine de maïs <i>Zea mays L.</i>
10 kg d'amidon de maïs <i>Zea mays L.</i>	8.5 kg d'amidon de maïs <i>Zea mays L.</i>
1 kg féculé de pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>	1.5 kg féculé de pomme de terre <i>Solanum tuberosum</i>
60 grammes de xanthane	60 grammes de xanthane

IV.6.5. Détermination des aptitudes à la panification de la farine composée des farines du haricot niébé, et des farines de riz et de maïs

À partir des produits F1 et F2, est prélevé 500 g de farine auxquels sont ajoutés 1g de sel de cuisine, 15g de levure sans gluten, 10 ml d'huile végétale et 350 ml d'eau. Un pétrissage pendant 10 min est réalisé. La pâte obtenue est laissée au repos pendant 1 h 30 min à température ambiante puis placée dans un moule et introduite dans un four réglé à 200°C. Après 20min de cuisson, le pain est retiré. Une évaluation qualitative des produits de panification est réalisée en se basant sur des paramètres physiques (Aspect, consistance et texture), olfactifs (Odeur) et gustatifs (Saveur). Les membres de l'équipe du laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée au nombre de 6 sont recrutés pour évaluer les deux produits de panification.

RÉSULTATS ET

DISCUSSION

CHAPITRE V : RÉSULTATS ET DISCUSSION

V.1. Évaluation de la réactivité et de la sensibilité clinique vis-à-vis du haricot niébé chez des patients allergiques aux légumineuses

Les résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la réactivité clinique vis-à-vis du haricot niébé chez des patients allergiques aux légumineuses, mais qui n'ont jamais consommé du haricot niébé auparavant sont donnés dans le tableau N° 6. Dans le groupe L, treize patients sur 14 présentent une allergie aux pois ou aux lentilles, un patient avec une allergie au haricot mungo uniquement. Les symptômes sont listés dans le tableau N°2. Les tests de provocation cutanés (Prick Test, PT) sont positifs pour le pois (14/14), pour la lentille (12/13), pour le lupin (8/14), pour le pois chiche (11/13) et pour le soja (3/13). Les PT au haricot niébé sont positifs chez 8/14 patients, 1/14 incertain. Le diamètre moyen du PT positif au haricot niébé est de 6,4 mm (intervalle de 3,5 à 11 mm). Les IgE spécifiques au haricot niébé sont positifs chez 4/13 patients (moyenne 1,8 kUA/L, intervalle : 0,9-2,6 kUA/L). Dans le groupe LP, les tests de provocation cutanés sont positifs pour l'arachide chez tous les patients, 11/13 pour le pois, la lentille et le fenugrec et chez 10/13 pour le soja et le lupin. Les tests de provocation cutanés au haricot niébé sont positifs chez 9/13 patients avec un diamètre moyen des papules de 10,5 mm (intervalle de 4-21 mm). Les IgE spécifiques à haricot niébé sont positifs chez 10/13 patients (moyenne : 24 kUA/L, intervalle 0,5-100 kUA/L). Les diamètres des papules des tests cutanés sont différents entre les deux groupes, avec une tendance générale à des diamètres de papules plus élevés dans le groupe LP, à l'exception du pois (Figure N° 3). La différence est hautement significative pour l'arachide et le pois dans leurs groupes respectifs, reflétant la stratification clinique initiale des participants. Les deux groupes diffèrent également par leurs niveaux d'IgEs, avec une tendance générale des IgEs plus élevée dans le groupe LP. Les patients du groupe LP ont des titres significativement plus élevés d'IgEs contre l'arachide ($P < 0,0001$), la lentille et le soja ($P < 0,001$), le pois et le lupin ($P < 0,01$) et le haricot niébé ($p < 0,05$) (Figure N° 4). En règle générale, les patients du groupe LP ont une réactivité cutanée et des taux d'IgEs plus élevées. Les tests de provocation cutanés et le dosage des IgEs révèlent une sensibilité élevée des patients vis-à-vis des extraits protéiques de haricot niébé (tableau N°6). Les IgEs à la viciline du haricot niébé sont détectées chez 71 % des patients. Sur les 17 patients avec un test cutané positif

au niébé, 11 patients ont des IgEs spécifiques au haricot niébé. La fréquence de la sensibilité des IgEs au haricot niébé est plus élevée dans le groupe LP et est associée à des titres plus élevés d'IgEs à l'arachide, au pois, au lupin, à la lentille et au soja.

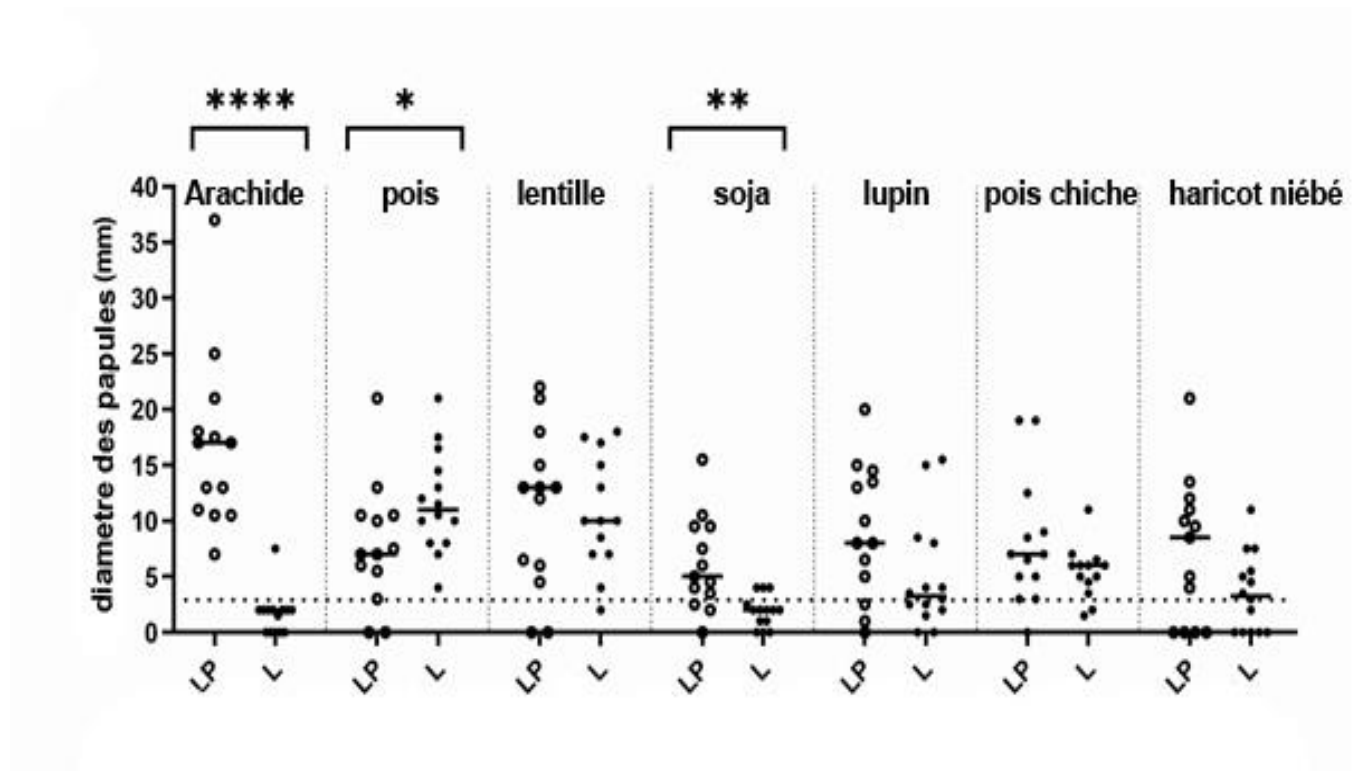


Figure N° 3: Profil des réactivités des patients vis-à-vis des légumineuses alimentaires selon les tests de provocation cutanés (Prick Test). Les valeurs médianes sont représentées par une ligne. La ligne en pointillé représente la valeur minimale au-dessus de laquelle le test est considéré comme négatif. Mann-Whitney t-test est utilisé pour la comparaison entre les deux sous-groupes. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

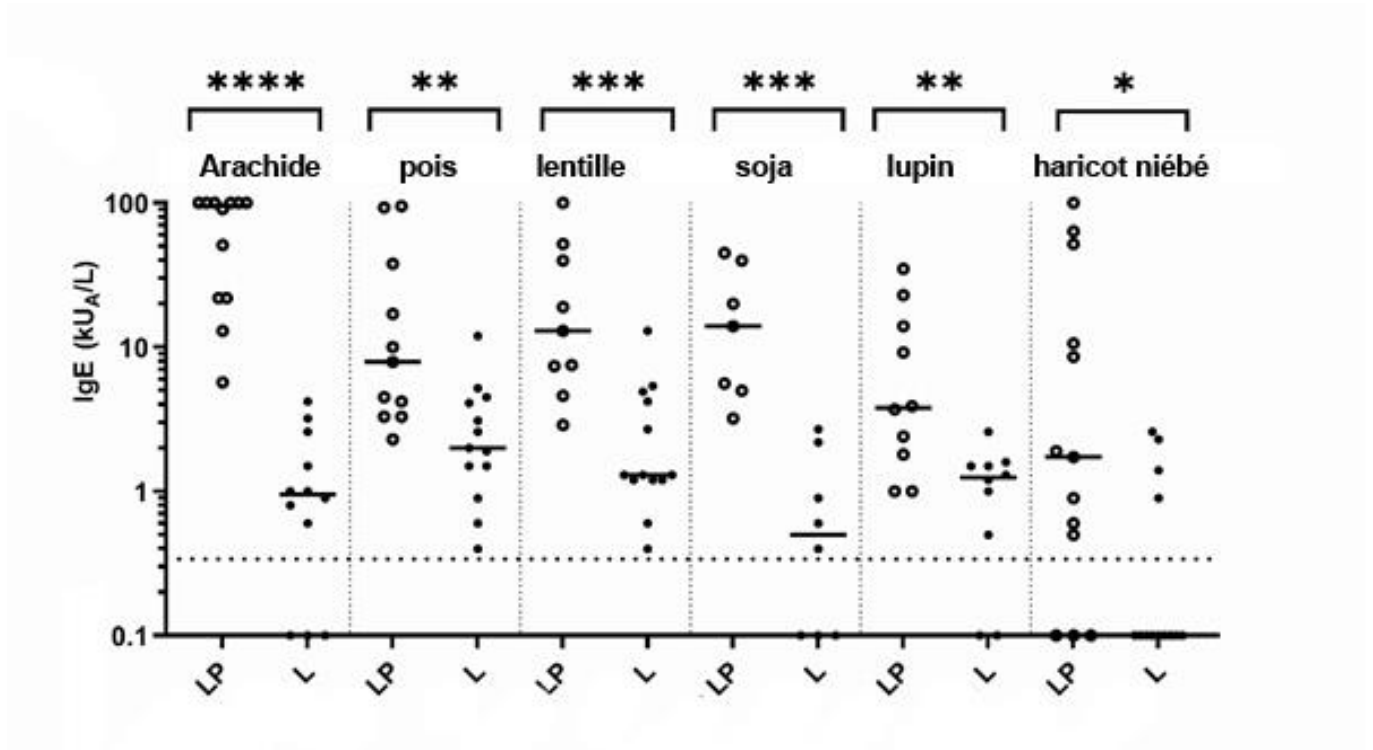


Figure N° 4 : Profil des réactivités IgEs des patients vis-à-vis des légumineuses alimentaires. Les valeurs médianes sont représentées par une ligne. La ligne en pointillé représente la valeur minimale au-dessus de laquelle le test est considéré comme négatif. Mann-Whitney t-test est utilisé pour la comparaison entre les deux sous-groupes. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

Tableau N° 6: Allergénicité des patients retenus à certaines légumineuses et résultats des tests cutanés et des immunoglobulines spécifiques (IgEs) mesurés par ImmunoCAP (thermo Fisher Scientific, Uppsala, Sweden).

	Âge (Année/sexe)	Symptômes cliniques	Pois vert (P)		Arachide (Ar)		Haricot niébé (C)		Viciline du niébé (V)	Lentille (L)		Lupin (Lu)		Soja (S)		CCD
			Prick test (mm)	IgEs (kU _A / L)	Prick test (mm)	IgEs (kU _A / L)	Prick test (mm)	IgEs(k U _A /L)	IgEs (kU _A /L)	Pri ck test (m m)	IgEs (kU _A / L)	Prick test (mm)	IgEs (kU _A / L)	Prick test (mm)	IgEs (kU _A / L)	IgEs (kU _A / L)
Patients allergiques aux légumineuses (Arachide non inclu) (Groupe L, n=14)																
PA-1	6 / f	SAO, DA, C (pois vert, OFC)	8	1.5	7.5	nd	0	<0.35	<0.35	nd	1.3	0	1.2	4	<0.35	nd
PA-2	5 / m	U, V (lentille)	14.5	4.1	2	0.6	7.5	2.6	1.9	13	4.9	15.5	1.5	2	0.9	<0.1
PA-3	4 / f	U, V (lentille)	13	0.4	2	<0.35	3	<0.35	<0.35	4	0.4	3	nd	0	<0.35	<0.1
PA-4	10 / m	SAO (pois vert, lentille)	10	0.9	0	nd	2	<0.35	<0.35	10	0.6	3.5	<0.35	1	nd	nd
PA-5	4 / f	U, AO (pois vert)	12	5.2	2	0.9	0	<0.35	<0.35	7	4.2	4	2.6	0	nd	<0.1
PA-6	1 / m	U, Vo, C (pois vert)	10	3.1	0	0.8	5.5	0.9	0.7	10	2.7	4	1.6	4	0.4	<0.1
PA-7	5 / m	U, AO (pois vert)	21	12	0	1	0	1.4	2.9	15	13	15	1.5	1	nd	<0.1
PA-8	3 / f	U (pois vert)	17.5	1.5	1.5	<0.35	4.5	nd	nd	17. 5	1.2	8.5	1	2	<0.35	<0.1
PA-9	6 / f	U, AO (pois vert, lentille)	10	1.9	2	1	3.5	<0.35	<0.35	18	1.3	2.5	0.5	2	0.6	<0.1

PA-10	9 / m	SAO, V (haricot mungo)	4	0.6	2	1.5	7.5	<0.35	<0.35	8.5	1.2	2	nd	2	2.2	0.7
PA-11	2 / m	U, V, A (pois vert)	7	4.5	0	4.2	5	2.3	1.7	7	5.4	1.5	nd	2.5	2.7	<0.1
PA-12	7 / m	SAO, U (pois vert, lentille)	11	2	2	3.2	11	<0.35	<0.35	2	1.3	2.5	1.3	2	nd	<0.1
PA-13	11 / m	V (pois vert)	8	Nd	2	<0.35	0	<0.35	<0.35	17	Nd	8	<0.35	4	nd	<0.1
PA-14	8 / m	AO, DA (pois vert, lentille)	16.5	2.6	0	2.6	0	<0.35	<0.35	10	1.2	0	nd	0	nd	0.7
Prévalence (%)	Sexe féminin: 36		100	100	7	75	57	31	31	92	100	57	80	21	63	17
moyenne	5.8		11.6	3.1	1.6	1.3	3.5	0.6	0.6	10. 7	3.0	5.0	1.1	1.9	0.9	0.1
Patients allergiques aux légumineuses (arachide inclu) (Groupe LP, n=13)																
PA-15	10 / f	SAO, V, DA (arachide) SAO, V (lentille) DA (mung bean)	7	17	10.5	>100	5	63.6	84	4.5	19	1	nd	4	20	nd
PA-16	6 / m	U, V (arachide) U (pois vert)	7.5	4.2	25	>100	0	0.5	<0.35	13	13	0	nd	2.5	nd	0.6
PA-17	7 / m	DA (arachide) U, AO (pois vert)	5.5	2.3	17.5	>100	12	0.9	<0.35	12	nd	6.5	1.8	10.5	5.6	0.1

PA-18	4 / m	U (arachide, pois vert)	21	7.9	13	5.7	9.5	8.6	2.8	18	7.4	8	3.9	9.5	nd	<0.1
PA-19	11 / m	V (arachide) U, A (pois verts, lentille, lait de soja)	7	3.3	7	22	10	<0.35	<0.35	6	nd	8	3.7	7.5	3.2	<0.35
PA-20	24 / m	AOL, V (arachide) AOL (soja)	6	3.3	18	51	11	1.9	<0.35	6.5	2.9	5	1	3.5	nd	<0.1
PA-21	7 / f	DA, AO (pois vert, lentille) DA (arachide)	13	93	13	22	8.5	>100	94.7	22	100	20	35	5	nd	nd
PA-22	9 / f	DA (arachide) DA, U, AO, A (lupin)	10.5	38	17	>100	0	<0.35	<0.35	13	52	13.5	23	6	45	<0.1
PA-23	4 / m	Arachide	10.5	4.5	10.5	13	4	1.73	0.4	15	4.6	2.5	nd	2	nd	0.5
PA-24	4 / m	U, V, A (arachide) A (lupin)	0	nd	11	91	0	<0.35	<0.35	0	nd	15	2.4	0	nd	<0.1
PA-25	4 / m	SAO, U, AO (arachide) U, R, A (fenugreek)	10	95	17	>100	21	51.9	22.3	13	40	10	14	9.5	40	8.2
PA-26	4 / m	V (arachide), U (protéine de soja)	0	nd	21	nd	0	0.6	<0.35	0	nd	14.5	1	4.5	14	<0.1

PA-27	12 / m	SAO, A (arachide)	3	10	37	>100	13.5	10.6	2.2	21	7.5	13	9.2	15.5	5	<0.1
Prévalence %	Sexe féminin : 23		85	100	100	100	69	77	46	85	100	77	100	77	100	27
moyenne	8.2		7.8	25.3	16.7	67.1	7.3	18.5	15.9	11. 1	27.4	9	9.5	6.2	19	0.84

Légende : (A) Asthme (AO) Angioœdème, (DA) Douleur Abdominale, (T) Toux, (AOL) Angioœdème Laryngé, (SAO) Syndrome d'Allergie Orale, (R) Rhinite, (U) Urticaire, (V) Vomissements. (CCD) Déterminant Carbohydrates Cross-réactif, (nd) non déterminé.

V.2. Identification des protéines allergènes

Aucun allergène du haricot niébé n'a été identifié à ce jour. **Rao et al, 2000 (94)** ont rapporté des réactions allergiques au haricot niébé survenues chez 6 patients indiens. La fraction albumine s'est avérée être responsable de l'allergénicité avec 2 principales bandes protéiques immunoréactives situées entre 41 et 55 kDa. Cependant, ces protéines ne sont pas identifiées. L'analyse par immunoblot de l'extrait protéique du haricot niébé révèle un schéma immunoréactif avec des bandes allant de 14 à 80 kDa. Les protéines du haricot niébé sont reconnues par la majorité des sérums des patients des deux groupes (Figure N°5 A et B). Les bandes immunoréactives majeures sont de $M_r = 28$ kDa et dans l'intervalle 45 à 60 kDa. Elles sont reconnues par la majorité des sérums des patients des deux groupes. La réactivité des sérums aux protéines du haricot niébé s'explique par la présence de protéines homologues dans les légumineuses alimentaires.

L'évaluation de l'hétérogénéité des protéines du haricot niébé est réalisée par électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines sont colorées au Sypro Ruby (Figure N°6). Plusieurs spots protéiques sont visibles et sont dispersés sur le gel. Les M_r sont compris entre 10 et 100 kDa, et les pI sont situés entre 3 et 10. L'identification et la caractérisation des protéines allergènes du haricot niébé sont réalisées en utilisant le sérum du Patient N°2. Le choix spécifique du sérum de ce patient est basé sur son profil de réactivité IgE, qui est partagé par au moins 7 patients (Figure N°5 A et Figure N°5 B). De plus, ce sérum est négatif pour les IgE spécifiques aux déterminants glucidiques à réaction croisée (CCD). L'immunoblot 2D a révélé la présence de plusieurs spots protéiques de $M_r = 24$ kDa, $M_r = 30$ kDa, $M_r = 49$ kDa, $M_r = 52$ kDa et $M_r = 60$ kDa et de pI localisé entre 3 et 9 (Figure N°7). Les protéines correspondantes aux taches immunoréactives sont excisées manuellement du gel 2-D et analysées par MALDI-TOF-TOF. À l'exception du spot N° 09, les 14 spots analysés ont fourni des spectres MS correspondant aux protéines de haricot niébé connues ou prédites (tableau N° 7). Il est identifié les sous-unités β -conglycinine α , sous-unités β -conglycinine β $M_r = 61$ et $M_r = 52$ kDa respectivement, la viciline $M_r = 49$ kDa ainsi que l'albumine-2S de $M_r = 25$ kDa (tableau N° 7). Plusieurs fragments C-terminaux appartenant aux sous-unités β et α de la

conglycinine de Mr = 30 kDa sont également identifiés. Ces fragments sont le résultat du phénomène de protéolyse naturelle.

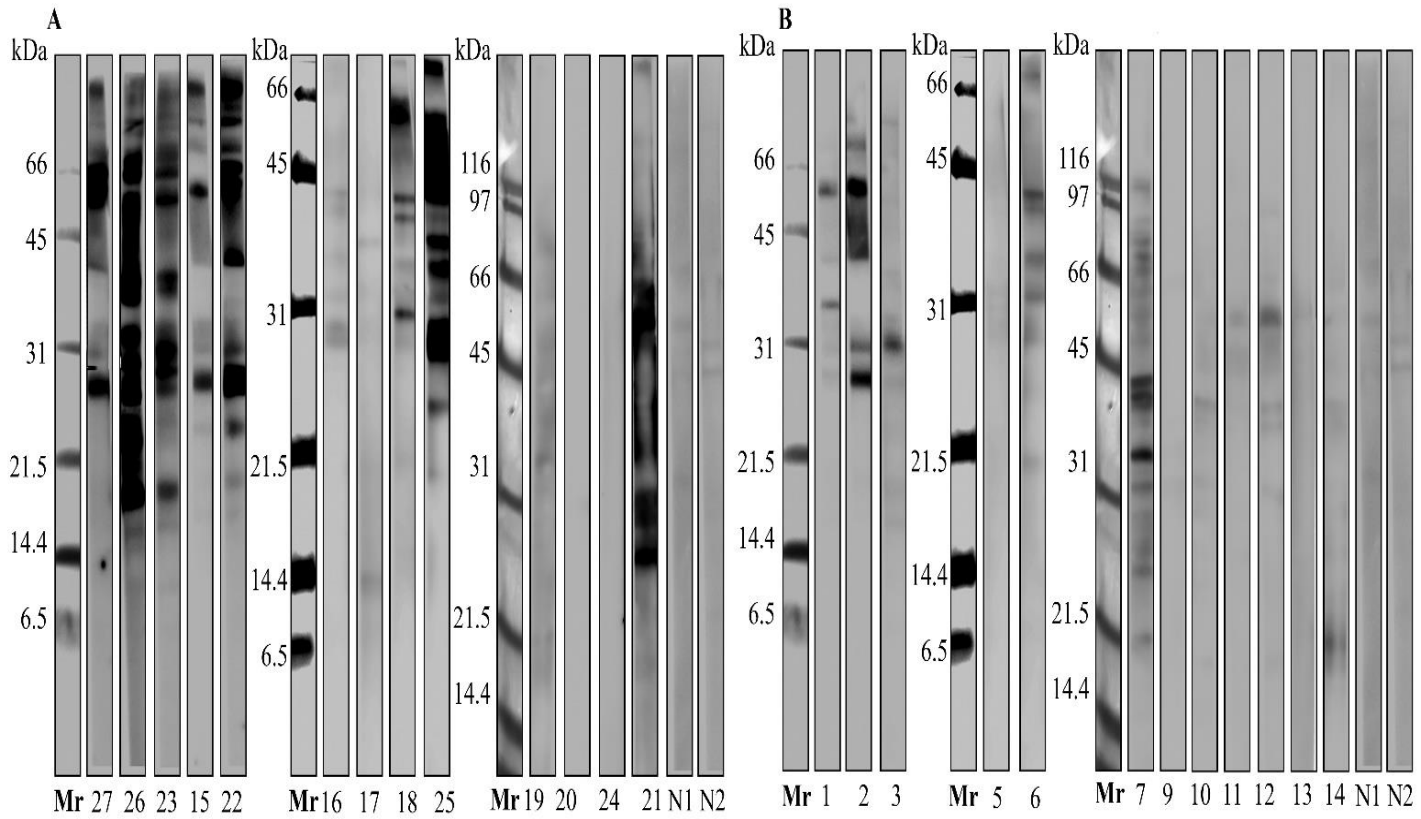


Figure N° 5: Immunoblot monodimensionnel de l'extrait protéique de haricot niébé. Mr : Marqueur de taille. 27, 26, 23, 15, 22, 16, 17, 18, 25, 19, 20, 24, 21 : numéros des sérums des patients allergiques aux légumineuses et à l'arachide groupe LP (A). 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 : numéro des sérums des patients allergiques aux légumineuses-groupe L (B). N1, N2 : N1 (Tampon de blocage), N2 (patient non allergique aux légumineuses) représentent les contrôles négatifs.

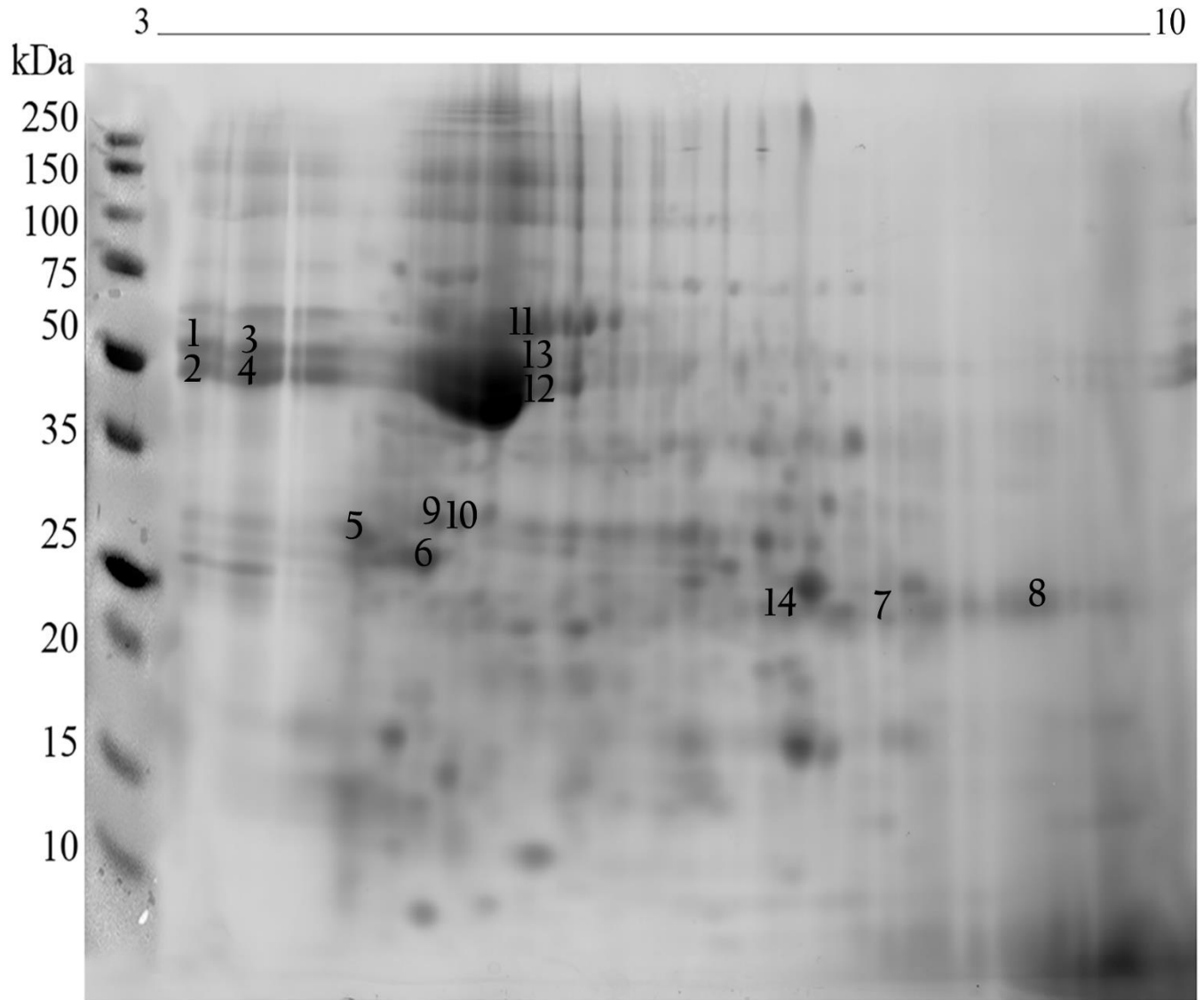


Figure N° 6: Électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide en sodium de dodécylsulfate SDS-PAGE 2D de l'extrait protéique du haricot niébé coloré en SYPRO .

- pI : 3 à 10 : Points isoélectriques

- Mr (kDa) : Marqueurs de tailles.

- Les spots protéiques : 1-14 protéines excisées et analysées par MALDI TOF TOF.

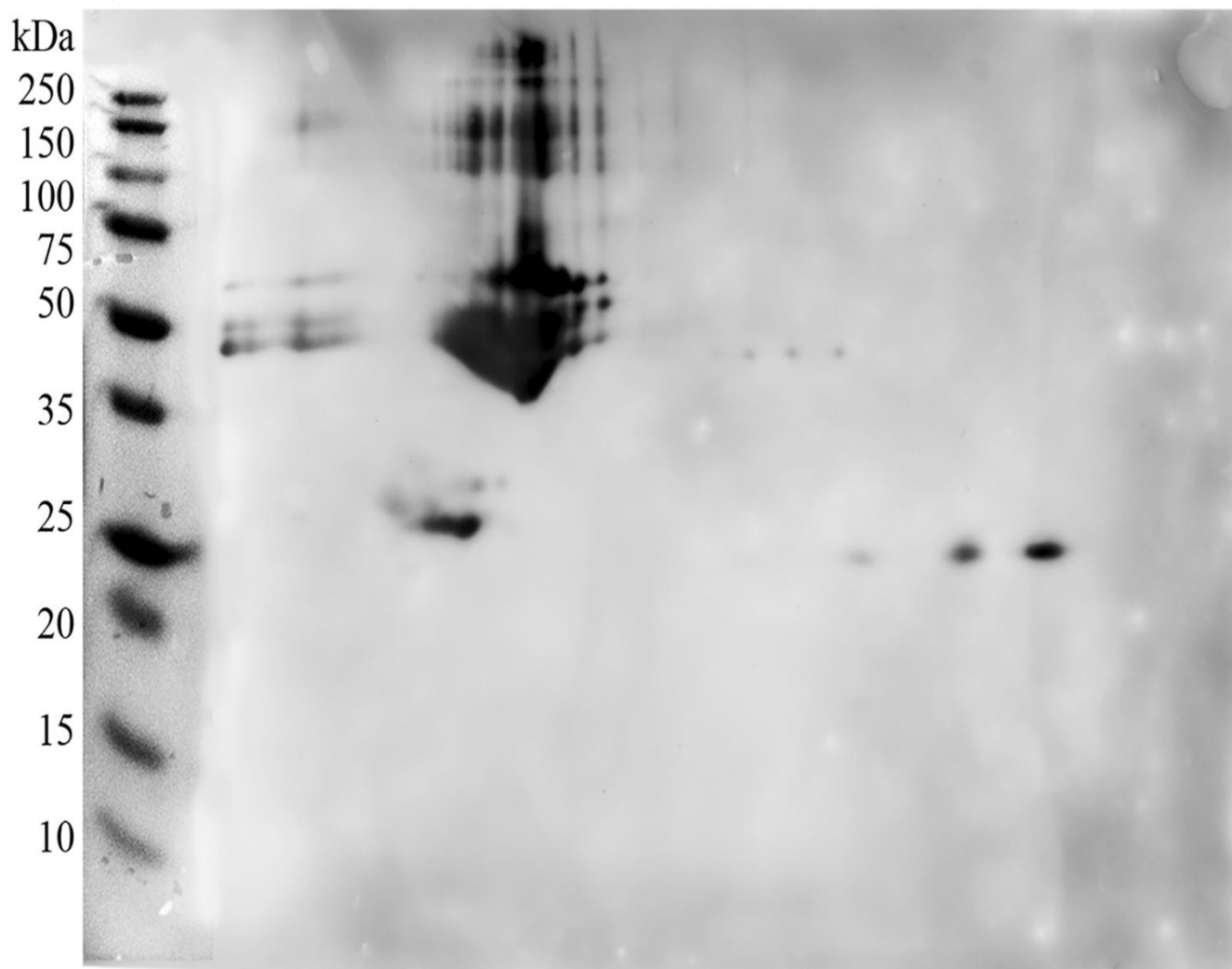


Figure N° 7: Immunoempreinte 2D des protéines du haricot niébé obtenues après incubation avec le sérum du patient 2.

- pI : 3 à 10 : Points isoélectriques.

- Mr : Marqueurs de tailles.

Tableau N° 7: Allergènes du haricot niébé identifiés par électrophorèse 2D et Spectrométrie de Masse.

Protéines identifiées	Espèces	Numéros d'accessions	Numéros de Spots	Fragments protéiques	Pourcentages de recouvrement (%)	Masses moléculaires calculées	Masses moléculaires observées	pI calculé	pI observé
β-conglycinine Sous unite β	<i>Vigna unguiculata</i>	XP_027908455	1, 3	Séquence totale	62.1, 63.2	52.6	53	5.3	3, 3.5
		XP_027937579	2	Séquence totale	75.1	52.6	49	5.4	3
		XP_027937583	4	Séquence totale	70.4	50.8	49	5.3	3.5
		XP_027937581	12, 13, 14	Séquence totale	86.7, 72.7, 47.7	51	60, 49, 53	5.3	5.5
		XP_027908455	5	C-terminale	64.9	24.2	29	4.7	4
		XP_027937583	6	C-terminale	48.9	24.1	26	5.1	4.5
B-conglycinine sous unite α	<i>Vigna unguiculata</i>	XP_027937578	10, 11	C-terminale	39.9, 49.3	25.2	30	5.4	4.8, 5
Viciline	<i>Vigna unguiculata</i>	AWS21471	2, 4, 15	Séquence totale	76.9, 67.4	80.6, 49.8	49	5.2	3, 3.5, 6

		CAP19902.1	14	Séquence totale	36.5	49.6	53	5.3	5.5
Albumine-2S	<i>Vigna unquiculata</i>	XP_027934370	7	Séquence totale	34.5	25.5	25	6.4	7

V.3. Réactivités croisées entre les protéines allergènes du haricot niébé et les protéines allergènes d'autres légumineuses alimentaires

Les analyses bio-informatiques et chimiques utilisées ont permis de mettre en évidence des réactivités croisées entre les protéines allergènes du haricot niébé et les protéines allergènes des légumineuses alimentaires connues telles que l'arachide, la lentille et le pois vert. Des alignements multiples en utilisant BLASTP et COBLAT montrent une identité de séquence d'acides aminés élevée (68 à 80 %) entre les sous-unités de viciline, les sous-unités β et α de la conglycinine. Des différences dans la séquence d'acides aminés sont principalement observées dans les régions N-terminales et C-terminales des protéines (Figure N°8). Les alignements des séquences protéiques de la viciline du haricot niébé et de l'albumine à l'aide de la fenêtre glissante de 80 acides aminés (<http://www.allergenonline.org>) donnent des identités encore plus élevées : 60 % avec Ara h 1, 69 % avec Lup an 1, 71 % avec Pis s 1, 73 % avec Len c 1, 78 % avec Gly m 5 et jusqu'à 96 % pour Vig r 4. Les protéines immunoréactives identifiées dans l'extrait protéique du haricot niébé sont citées dans la littérature. Des protéines homologues à la viciline 7S du haricot niébé sont citées pour l'arachide (Ara h 1), le soja (Gly m 5), la lentille (Len c 1), le pois vert (Pis s 1) ainsi que le haricot mungo (Vig r 2). Les albumines 2S sont très fréquemment identifiées comme allergènes dans l'arachide (Ara h 2), du soja (Gly m 8) et du haricot mungo (Vig r 4) (Tableau N° 8 et 2). L'albumine-2S, la viciline et les sous-unités β -conglycinine α et β sont homologues à d'autres allergènes de légumineuses connues, partageant des pourcentages d'identité de 44 % à 86 %, indiquant une réactivité croisée potentielle pour ces allergènes avec une identité de séquence supérieure à 50 %. Les tests d'inhibition ELISA montrent des réactivités croisées des IgEs entre le haricot niébé, le pois et l'arachide. Les précipitations successives au chlorure de sodium ont permis d'obtenir une fraction enrichie en viciline (V) du haricot niébé, constitué de 2 bandes majeures de $M_r = 49$ et $M_r = 52$ kDa, ainsi que des bandes mineures de $M_r = 62$ kDa, de $M_r = 31$ kDa et de $M_r = 24$ kDa (Figure N°9 A). La présence de polypeptides de viciline est confirmée par un antisérum polyclonal de lapin anti-Ara h 1 (Figure N°9 B). L'inhibition de la liaison des IgEs aux pois à l'aide d'extrait protéique du haricot niébé et de la fraction enrichie en viciline montrent que les deux inhibiteurs provoquent une inhibition pertinente (> 10 %) de la liaison des IgE au pois dans 19 sérums de

patients sur 24 pour le niébé et chez 21 sur 24 pour la viciline (moyenne d'inhibition : 54,57 % pour le haricot niébé allant de 16,05 % à 85,56 % et 44,12 % pour la viciline allant de 10,31 % à 85,42 %) (Figure N° 10 A). L'inhibition de la liaison des IgEs à l'extrait d'arachide est détectée dans 8 sérums de patients sur 13 pour le haricot niébé et 9/13 pour la viciline (moyenne d'inhibition : 48,57 % pour le niébé allant de 11,92 % à 81,88 % et 49,11 % pour la viciline allant de 10,46 % à 82,47 %) (figure N° 10 B). L'inhibition de la liaison aux IgEs à l'aide du haricot niébé ou de la viciline est hautement significative pour l'arachide, modérément significative pour le pois ($r = 0,9282$, $P < 0,0001$ pour l'arachide ; $r = 0,4065$, $P = 0,0487$ pour le pois). Il est confirmé que la viciline est le principal allergène responsable de la réactivité croisée (Figure N° 19 AB). Lors de la comparaison des niveaux d'inhibition des IgEs dirigés contre les protéines de pois en utilisant le haricot niébé comme inhibiteur dans les deux groupes de patients, la moyenne d'inhibition est significativement plus élevée dans le groupe L (valeur $P < 0,001$) (Figure N° 10 C). La viciline provoque également une moyenne d'inhibition plus élevée dans ce groupe, mais la différence avec le groupe LP n'est pas significative. Il est démontré que les IgEs dirigés contre le haricot niébé, le pois et l'arachide sont des IgE cross-réactifs.

Pour le test d'activation des basophiles des patients allergiques aux légumineuses (Figure N° 11) vis-à-vis du haricot niébé, tous les patients (6 patients du groupe LP : n° 15, n° 12, n° 18, n° 19, n° 20, n° 24 et n° 5 patients du groupe L : n° 7, n° 9, n° 10, n° 11, n° 14) montrent une activation significative des basophiles ($> 15\%$ de CD63+) à au moins une concentration de chaque extrait (Figure N° 12 - Figure N° 18). La réactivité et la sensibilité des patients du groupe LP aux légumineuses considérées sont plus élevées que celles des patients du groupe L. L'arachide, le pois et la lentille sont associés à la réactivité et à la sensibilité des basophiles les plus élevées, en accord avec les antécédents cliniques. En revanche, pour le groupe L, des concentrations élevées d'allergènes sont nécessaires pour activer de manière significative les basophiles. Cela indique qu'une réactivité dans cette plage de concentration pourrait être cliniquement non significative, ce qui est conforme aux données précédentes. Cependant, des concentrations relativement élevées sont également nécessaires pour l'activation des basophiles à l'aide de pois et de lentille malgré que ces patients

sont cliniquement réactifs au pois et/ou à la lentille. Ceci s'explique par le profil de réactivité clinique du groupe L. En effet, ce dernier présente une allergie primaire aux pois et aux lentilles, associée à des valeurs IgEs et SPT faibles en comparaison au groupe LP, où la réactivité clinique aux légumineuses est plus large et où les Valeurs IgE/SPT sont beaucoup plus élevées. De plus, il est démontré que les niveaux d'anticorps IgE régulent l'expression du récepteur FcεRI. La liaison des IgE au FcεRI stabilise l'expression du récepteur, ce qui augmente le nombre de FcεRI à la surface des cellules. Un nombre élevé de récepteurs FcεRI de surface permet aux cellules de se lier à plus d'IgE, leur permettant de libérer des médiateurs même à faible concentration d'allergènes (103). La réactivité plus élevée des basophiles dans le groupe LP reflète une réaction clinique plus forte de ces patients. En effet, 4 patients sur 6 ont signalé des vomissements lors de l'ingestion d'arachide, alors que dans le groupe L, seuls 2 patients sur 5 ont signalé des vomissements et 3 patients sur 5 ont signalé un œdème de Quincke lors de l'ingestion de légumineuses. Comme aucun test de provocation oral n'est effectué, les seuils déclencheurs de symptômes ne sont pas connus pour les patients. Les profils d'activation des basophiles sont bien établis pour le diagnostic de l'allergie aux arachides, mais ils nécessitent une évaluation plus poussée en cas d'allergie aux légumineuses associée à une tolérance à l'arachide. La réactivité basophile significative chez les patients, la liaison des IgEs aux protéines du haricot niébé et les tests cutanés positifs chez la majorité des patients, indique un risque potentiel de réactivité clinique chez les patients polysensibilisés.

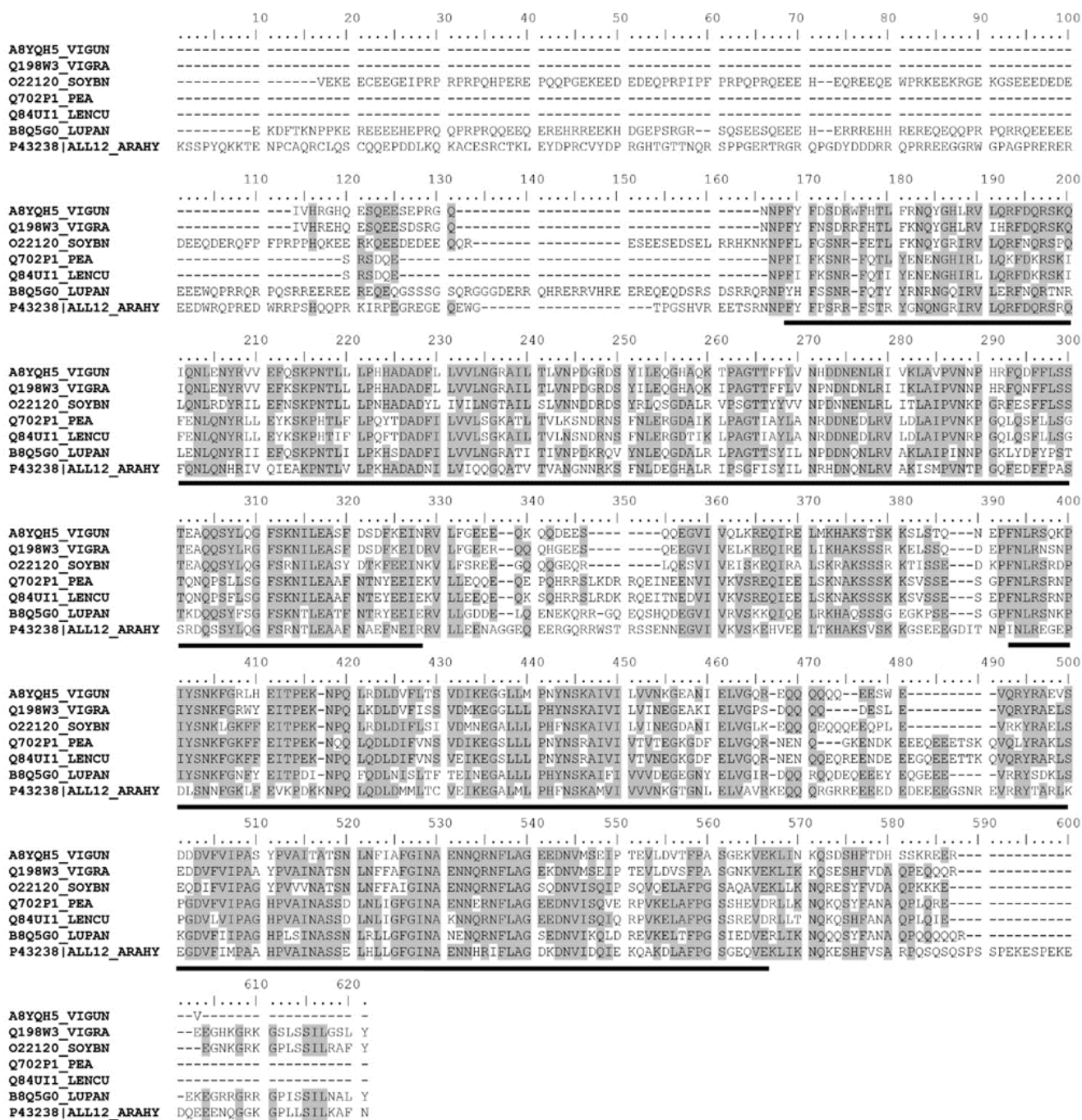


Figure N° 8: Alignement de la séquence d'acides aminés de la viciline du haricot niébé (n° d'accesion A8YQH5) avec les séquences d'acides aminés des allergènes du haricot mungo (n° d'accès Q198W3), soja (n° d'accès O22120), pois (n° d'accès Q702P1), lentille (n° d'accès n°Q84U11), lupin (n° d'accès B8Q5G0) et arachide (n° d'accès P43238). Les sections soulignées correspondent aux domaines conservés des cupines de type 1 selon UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Les acides aminés marqués en gris sont identiques dans au moins 4 séquences protéiques.

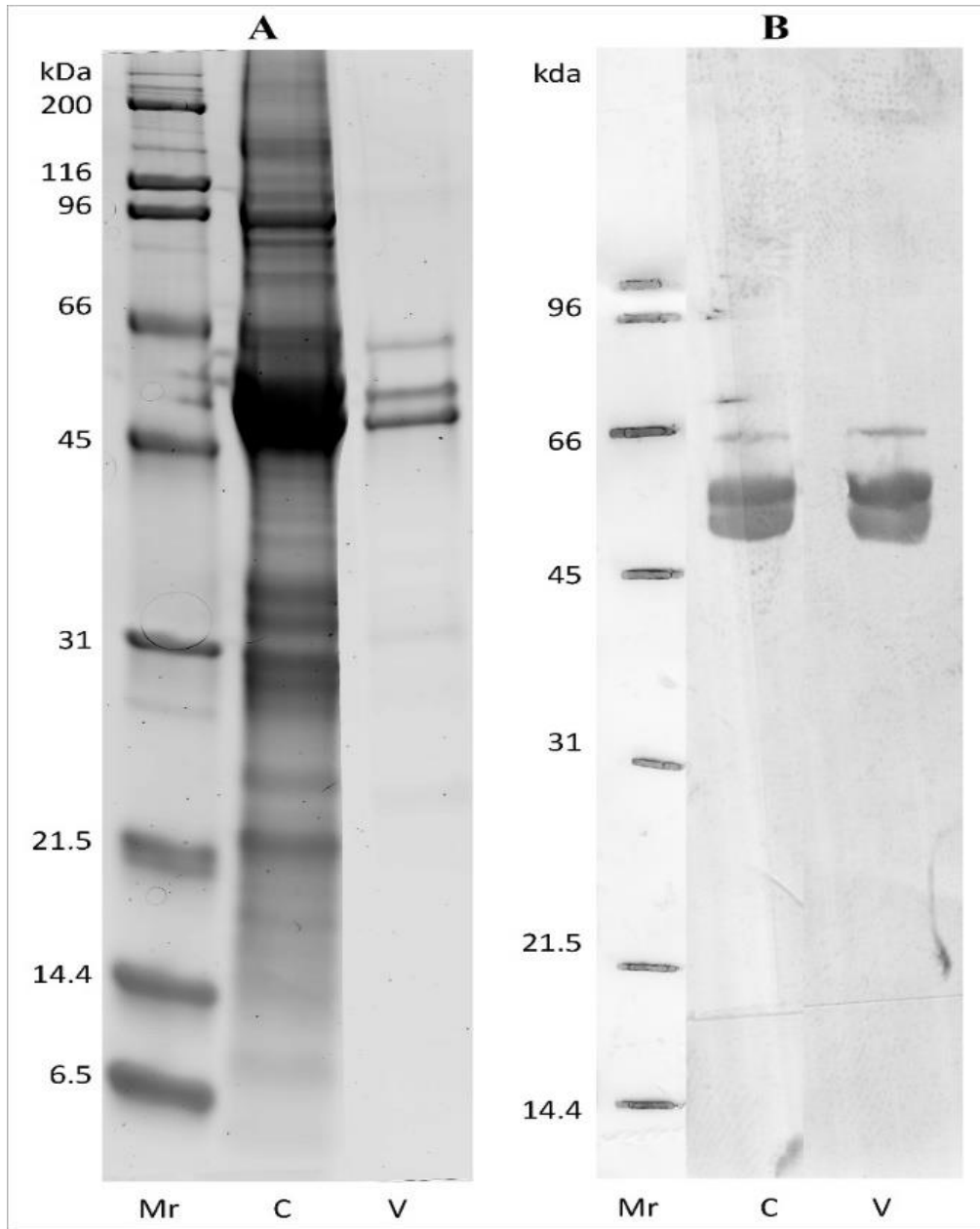


Figure N° 9: **A** - Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) de l'extrait protéique du haricot niébé (C) et de la fraction enrichie en viciline (V) obtenue par précipitations successives au chlorure de sodium (A). Coloration des protéines au SYPRO Ruby. **B** - Immuno-empreintes de l'extrait protéique du haricot niébé (C) et de la fraction enrichie en viciline (V). Mr : Marqueurs de tailles.

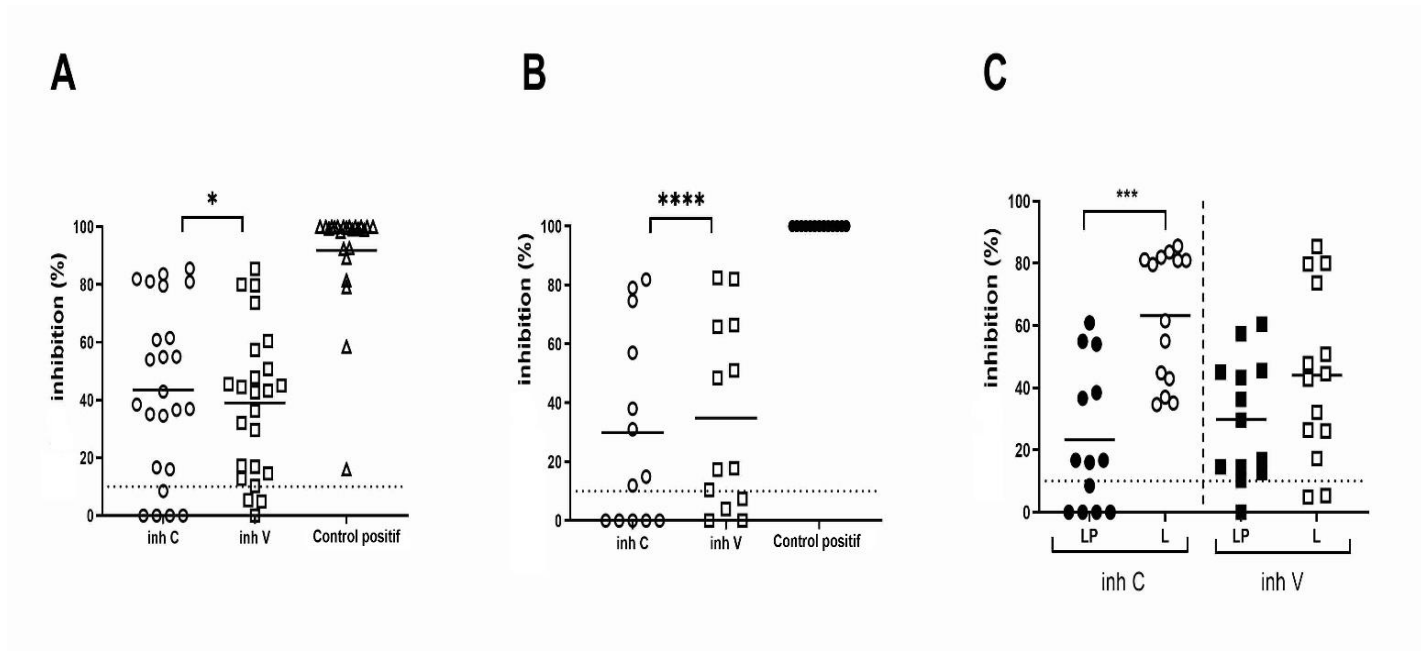


Figure N° 10: Inhibition ELISA de la liaison des IgE aux protéines de pois (A) et d'arachide (B) à l'aide d'extrait de haricot niébé (inh C) et d'une fraction enrichie en viciline (inhV). Comparaison des niveaux d'inhibition des IgE dirigées contre les protéines de pois dans les groupes de patients LP et L en utilisant du niébé et la fraction de viciline enrichie (C). Le test t de Mann Whitney est utilisé pour la comparaison entre les groupes (C). Les corrélations entre les inhibitions à l'aide des extraits C et V sont calculées par Spearman. Les valeurs moyennes sont représentées par des lignes. La Ligne pointillée correspond à la valeur seuil pour laquelle l'inhibition est considérée comme pertinente. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

Tableau N° 8: Homologie des Séquences d'acides aminés des protéines allergènes du haricot niébé et celles de certaines légumineuses alimentaires

Allergènes du haricot niébé	Allergènes homologues	Numéros d'accessions	Espèces	Pourcentages d'identité (%)
Viciline (AWS21471, CAP19902.1, A8YQH5)	Globuline 8S isoforme β (Vig r 2)	Q198W3	<i>Vigna radiate</i>	83.7-85.6
	Sous-unité α de la β conglycinine (Gly m 5)	O22120	<i>Glycine max</i>	63.2-64.7
	Convicine (Pis s 2)	P13915	<i>Pisum sativum</i>	53.1-54.0
	Viciline (Pis s 1)	Q702P1		54.6-55.6
	Gamma-vicine (Len c 1)	Q84UI1	<i>Lenc culinarius</i>	57.1-57.6
	Conglutine β (Lup an 1)	B8Q5G0	<i>Lupinus angustifolius</i>	53.7-56.1
	Conglutine β 1 (Lup a 1)	Q53HY0	<i>Lupinus albus</i>	54.4-56.3
Cupine (Ara h 1)	P43238	<i>Arachis hypogaea</i>	48.9-50.6	
B-conglycinine sous unité β (XP_027908455, XP_027937581, XP_027937583, XP_027937579)	Isoforme B 8S globuline (Vig r 2)	Q198W3	<i>Vigna radiate</i>	82.7-86.0
	Sous-unité A de la conglycinin β (Gly m 5)	O22120	<i>Glycine max</i>	62.9-64.7
	Convicine (Pis s 2)	P13915	<i>Pisum sativum</i>	50.6-54.0
	Vicilin (Pis s 1)	Q702P1		54.0-56.1
	Gamma-vicine (Len c 1)	Q84UI1	<i>Lenc culinarius</i>	55.0-57.9
	Conglutine β (Lup an 1)	B8Q5G0	<i>Lupinus angustifolius</i>	54.1-56.3
	Conglutine β 1 (Lup a 1)	Q53HY0	<i>Lupinus albus</i>	53.8-56.3
Cupine (Ara h 1)	P43238	<i>Arachis hypogaea</i>	49.7-51.6	

B-conglycinine sous unité α (XP_027937578)	Isoforme β 8S globuline (Vig r 2)	Q198W3	<i>Vigna radiate</i>	68.3
	Sous-unité α de la conglycinin β (Gly m 5)	O22120	<i>Glycine max</i>	62.8
	Convicine (Pis s 2)	P13915	<i>Pisum sativum</i>	47.7
	Vicine (Pis s 1)	Q702P1		55.7
	Gamma-vicine (Len c 1)	Q84UI1	<i>Lenc culinarius</i>	57.2
	Conglutine β (Lup an 1)	B8Q5G0	<i>Lupinus angustifolius</i>	46.2
	Conglutine β 1 (Lup a 1)	Q53HY0	<i>Lupinus albus</i>	48.9
	Cupine (Ara h 1)	P43238	<i>Arachis hypogaea</i>	44.3
Albumin-2S (XP_027934370)	Seed albumine Vig r 4	Q43680	<i>Vigna radiate</i>	87.5

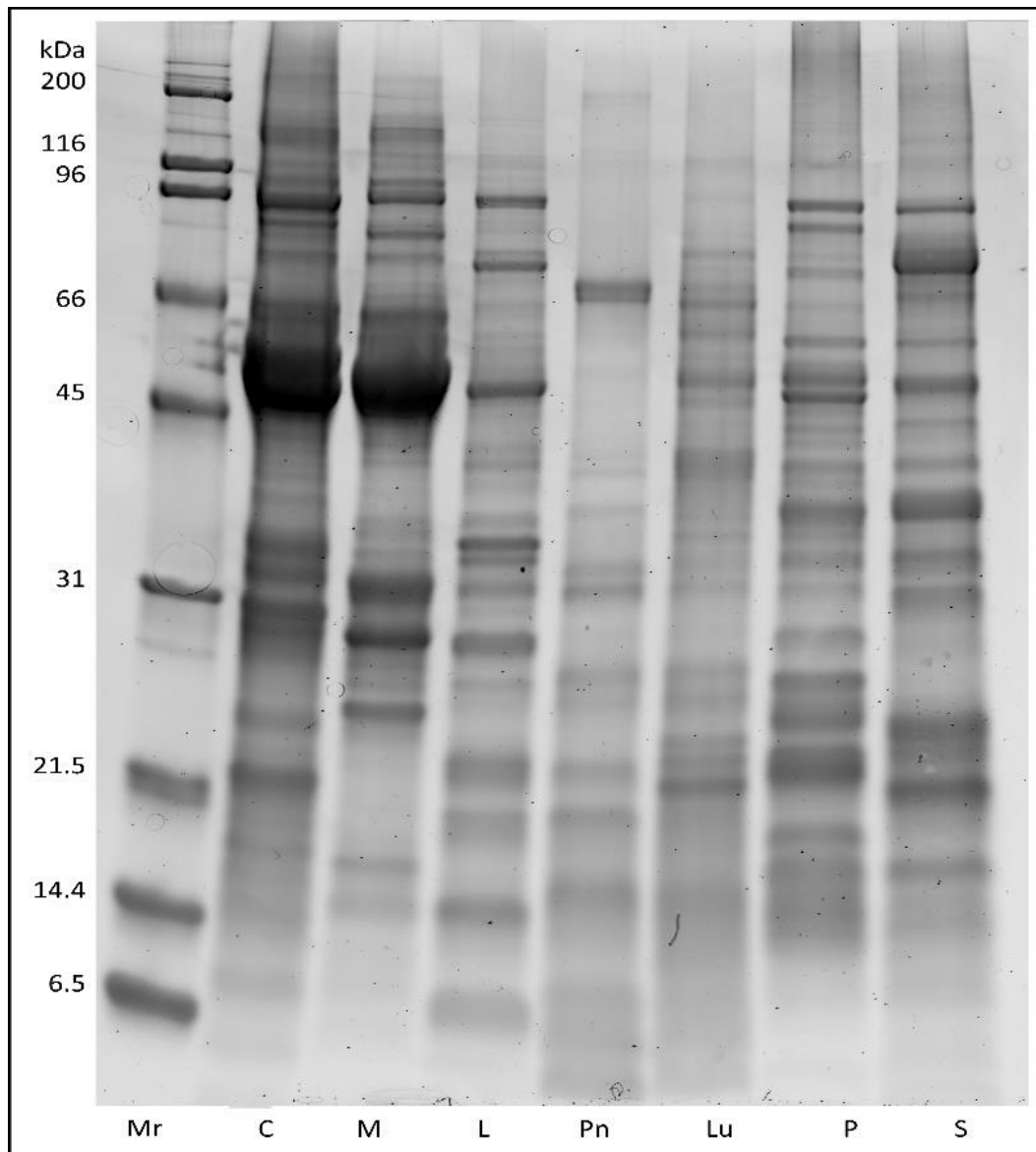


Figure N° 11: Diagrammes électrophorétiques des extraits protéiques bruts préparés à partir de C : haricot niébé, M :haricot mungo, L : lentille, Pn : arachide, Lu : lupin, P : pois, S : soja). Mr : Marqueurs de masses moléculaires allant de 6,5 à 200kDa. Coloration des protéines est réalisée à l'aide du SYPRO Ruby.

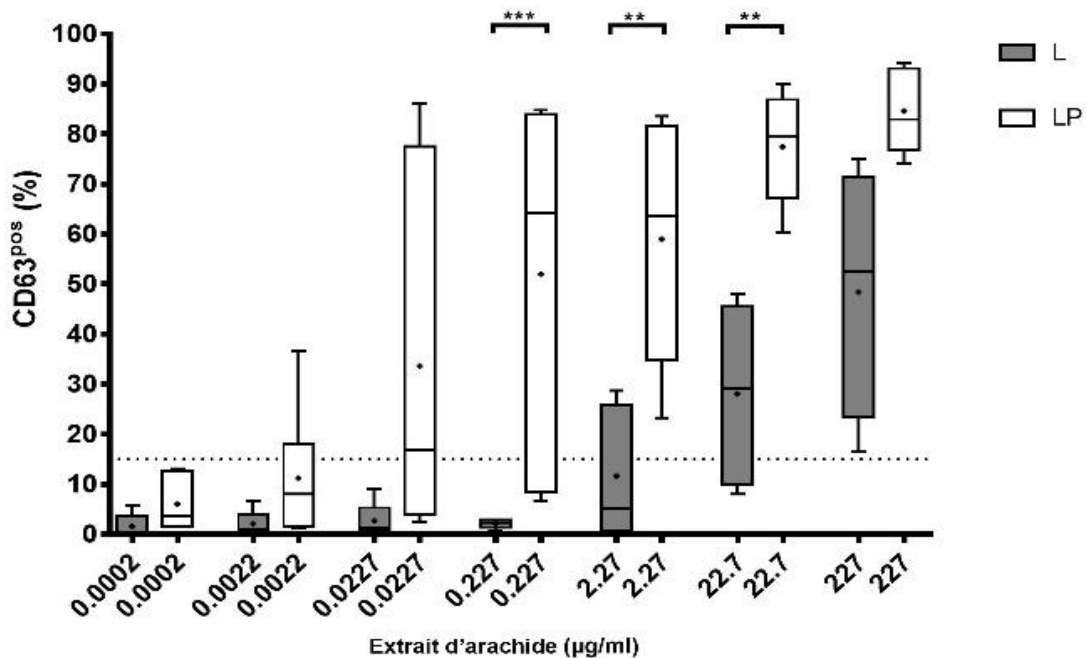


Figure N° 12: Réponse des basophiles aux extraits de protéines d'arachide chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63% pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

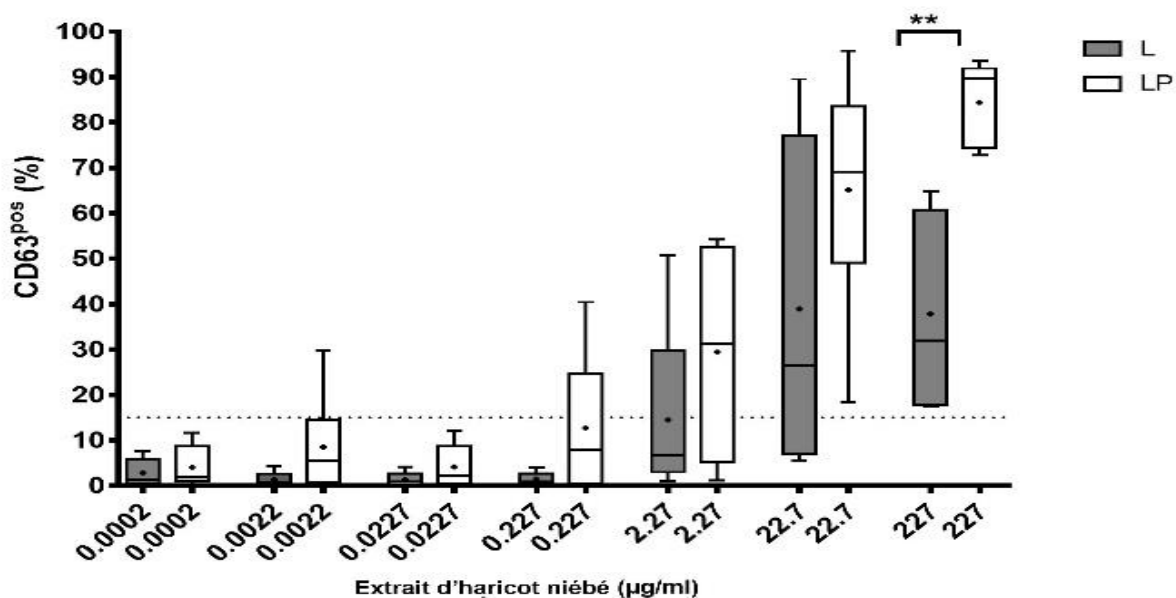


Figure N° 13: Réponse des basophiles aux extraits de protéines du haricot niébé chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil de 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63 % pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

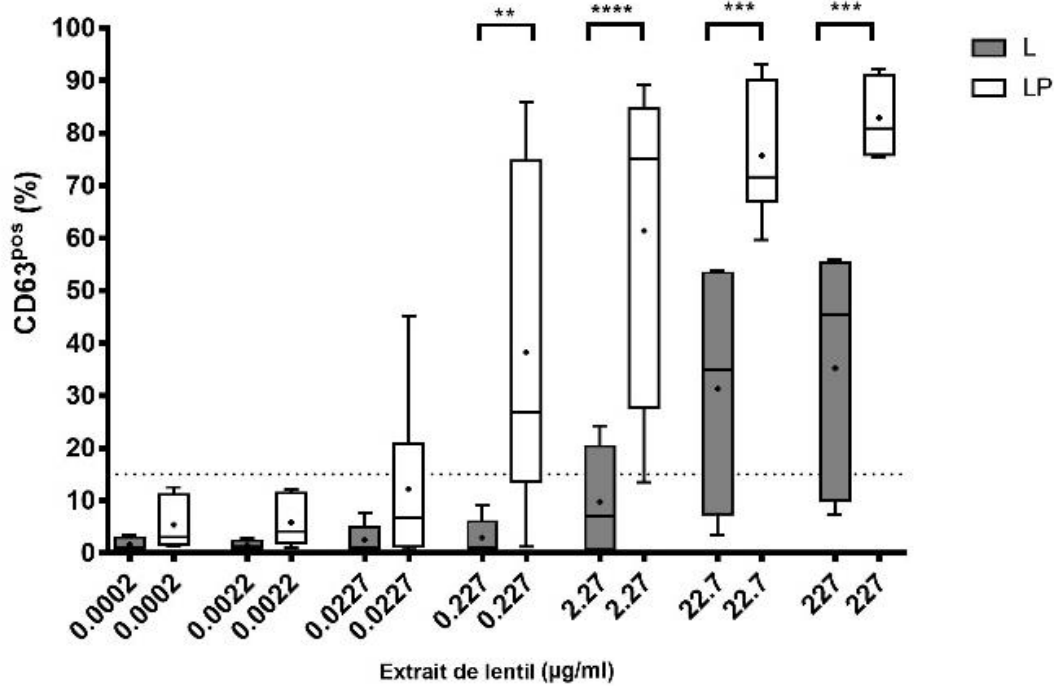


Figure N° 14: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de lentille chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil de 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63 % pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

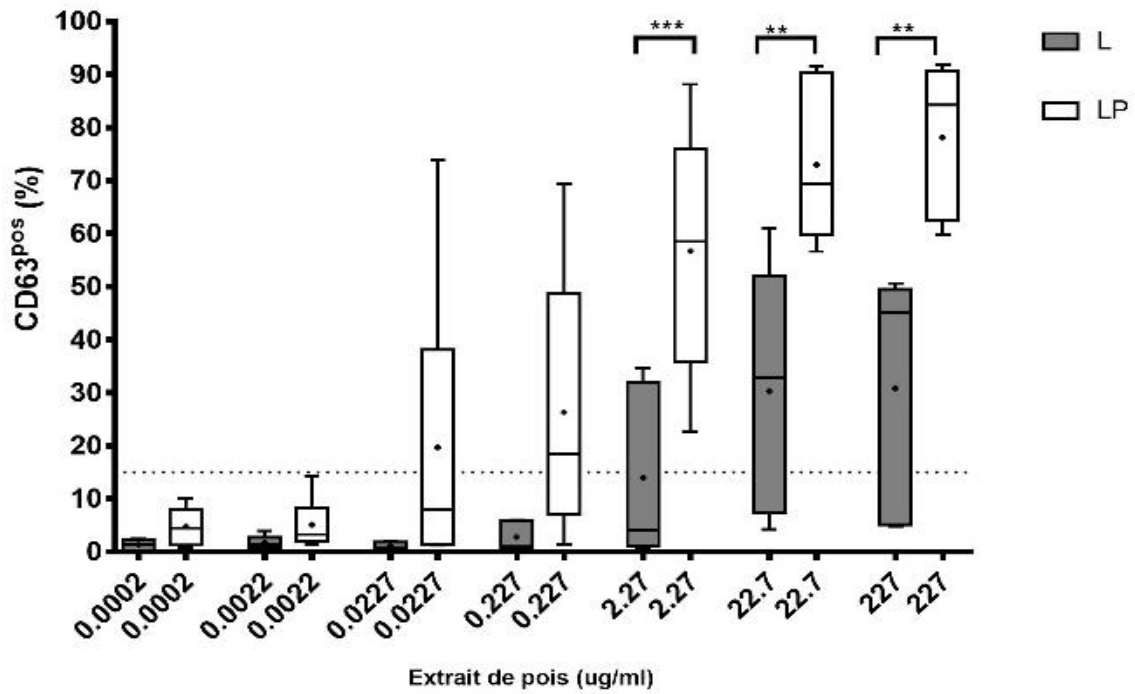


Figure N° 15: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de pois vert chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil de 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63 % pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

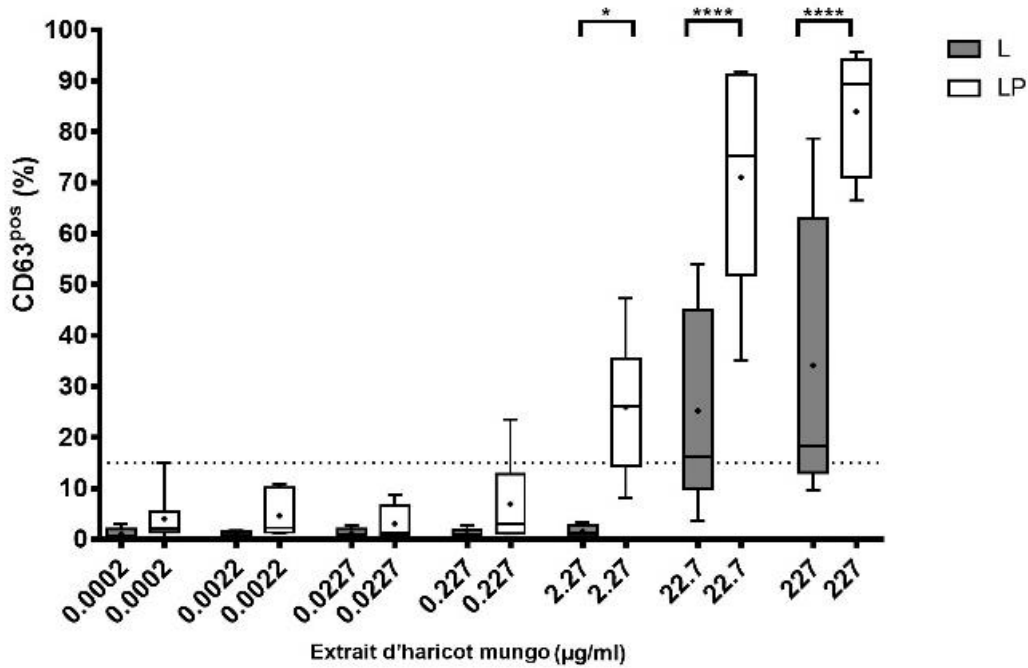


Figure N° 16: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de haricot mungo chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil de 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63% pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

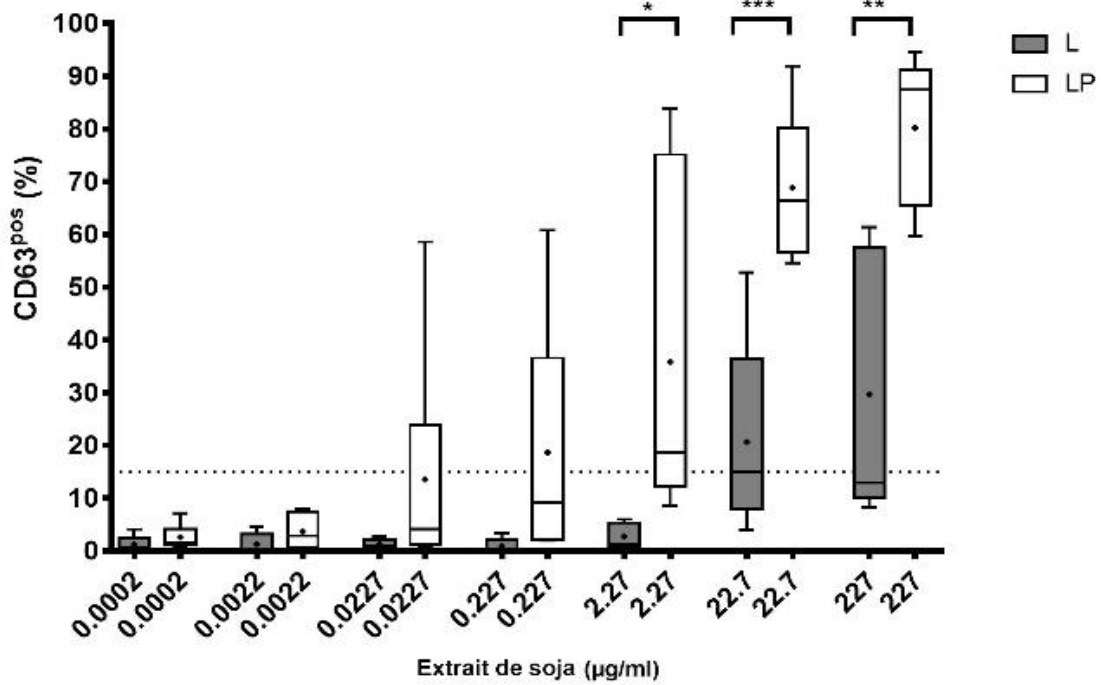


Figure N° 17: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de soja chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil de 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63% pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

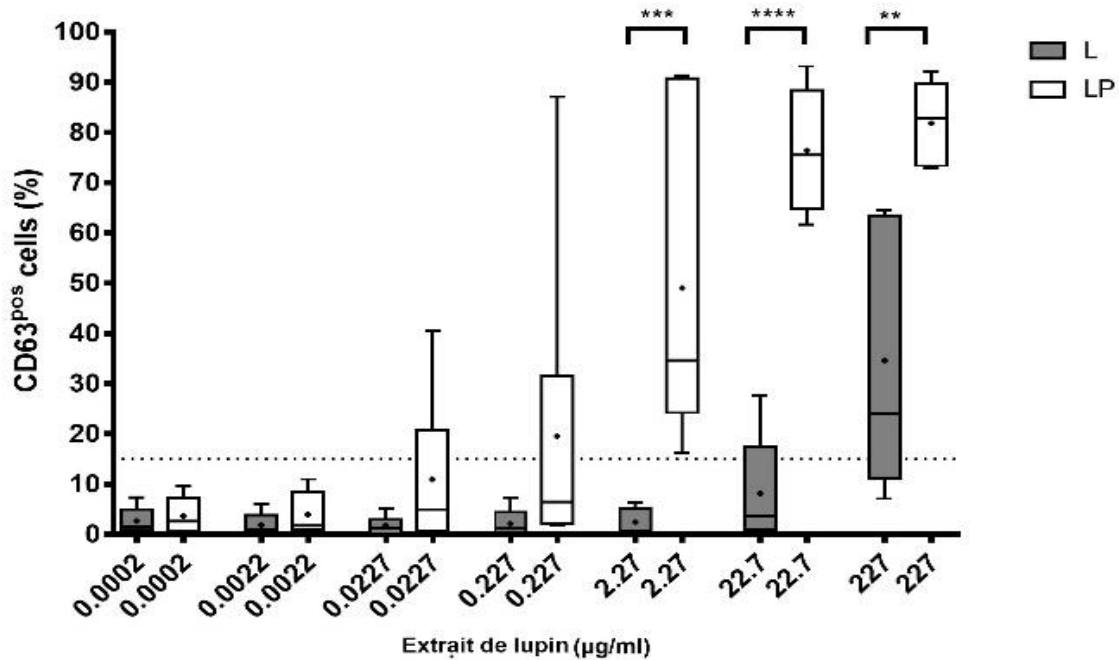


Figure N° 18: Réponse des basophiles aux extraits de protéines de lupin chez les patients allergiques aux légumineuses et aux arachides (sous-groupe LP) (n = 6) et chez les patients allergiques aux légumineuses sans allergie à l'arachide (sous-groupe L) (n = 5). Les valeurs médianes et moyennes sont représentées respectivement par des lignes et des croix. La valeur seuil de 15% est représentée par une ligne pointillée, correspond à la valeur minimale de CD63% pour laquelle la réactivité des basophiles est considérée comme positive.

V.4. Analyse de la composition biochimique et composition en macroéléments de la graine du haricot niébé.

V.4.1. Analyse de la composition biochimique

Dans le tableau N° 9 sont données les teneurs en eau, en protéines, en glucides, et en lipides du haricot niébé. La teneur en eau du haricot niébé est de 9.28 ± 0.80 g/100g. Ceci est un avantage par rapport à la conservation des graines sur une durée assez longue. Une teneur en eau de 9 % est convenable pour le stockage des graines séchées. Le taux en protéines totales est de 24.04 ± 0.49 g/100g. Le résultat obtenu est comparable à ceux déterminés par **Boye et al, 2016 (104)** ($20.63 \pm 0.02\%$) pour le cultivar N3KR de la cote d'ivoire et avec ceux trouvés par **Hamid et al, 2015 (105)** ($19.6 \pm 0.04\%$) pour le cultivar rouge. Ils diffèrent des taux calculés par **Chinma et al, 2008 (106)** (25.79 à 29.95%). Il est supérieur au taux de protéines trouvées dans les céréales comme le riz (*Oryinza sativa*) (7.9%), l'orge (*Hodeum vulgare*) (12.5%), le maïs (*Zea mays*) (9.45%) et le blé (*Tritrium spp*) (13.44%). Les protéines du haricot niébé sont constituées en majorité de globulines ($68.92 \pm 0.02\%$ des protéines totales) et d'albumines ($33.27 \pm 0.01\%$ des protéines totales). Ces proportions sont différentes de celles révélées par **Freitas et al ;2004 (107)** (albumine 45%, globulines 51%, prolamines 1%, glutelines 3%). Les albumines se caractérisent par une richesse en acides aminés basiques (thréonine, tyrosine, histidine, proline) et une déficience en phénylalanine et leucine. Tandis que les globulines se distinguent par de faibles teneurs en acides aminés acides et de fortes teneurs en acides aminés basiques (notamment en lysine qui est considérée comme étant un acide aminé limitant dans la plupart des céréales) et phénylalanine. La déficience en acides aminés soufrés est connue chez les cultivars de haricot niébé. Le haricot niébé peut être précieux pour la supplémentation dans certains régimes en complément aux céréales. Cependant, la viciline, la B-conglycinine et l'albumine 2S sont des protéines allergènes capables de provoquer des réactions immunologiques indésirables chez les individus sensibilisés (3). L'amidon constitue 62.5 ± 0.12 g/100g de la farine de haricot niébé. Il est l'élément dominant et le composant énergétique essentiel. Il représente environ 70 à 80% de la matière sèche des céréales, 30 à 70 % de la matière sèche des graines des légumineuses et 65 à 85% de la matière sèche des tubercules. De ce fait, de part de sa richesse en protéines et en glucides complexes, le haricot niébé peut être utilisé pour lutter

contre la malnutrition protéino-énergétique. Le taux de cellulose brute du haricot niébé est de 6.39 ± 0.03 g/100g. Cette valeur est sensiblement proche de celles rapportées par **Kumaraguru Vasgam et al. (2007) (108) et Butt et Batool (2010) (109)** ($6.95-7.95$ g/100g). Chez les autres légumineuses, la teneur en cellulose brute varie de 2.8 à 3.7 g/100g pour le pois chiche, $3.38-4.7$ g/100g pour le haricot et de $4.9- 5.7$ g/100g pour la lentille **(110,111)**. Le taux de cellulose brute varie d'une légumineuse à l'autre. La teneur en lignine du haricot niébé représente 1.8 ± 0.06 g/100g. Tout comme la cellulose, ce polysaccharide de structure des végétaux est totalement indigestible par l'organisme humain. De part de leur capacité d'absorption d'eau, la lignine et la cellulose améliorent le transit intestinal et constituent un prébiotique pour la flore intestinale. Elles donnent un sentiment de satiété et ont un effet laxatif. Elles diminuent le risque de diabète de type 2 et d'hypercholestérolémie, ainsi que de cancer du côlon et du rectum **(112-113)**. Le taux de lipides du haricot niébé est de 2.10 ± 0.30 g/100g. Il est sensiblement supérieur aux taux de lipides obtenus pour 6 populations locales provenant de différentes régions d'Algérie (El-Kala, et Tizi-Ouezou) (1.35 g/100g à 1.66 g/100g. Il est inférieur par rapport aux taux de lipides de 14 cultivars de haricot niébé provenant de Côte d'Ivoire (3.19 ± 0.6 g/100g). Le faible taux de lipides est rapporté pour la majorité des légumineuses alimentaires à l'exception du pois chiche. Il facilite l'extraction des protéines et de l'amidon pour leur utilisation dans l'industrie alimentaire sans délipidation **(114)**.

Tableau N° 9 : Teneur en eau et composition en macronutriments du haricot niébé

Paramètres	Teneurs (g/100g)
Eau	9.28 ±0.80
Protéines totales	24.04 ±0.49
• Albumines	8.00 ±0.22
• Globulines	16,57 ±0,88
Lipide	2.10%±0.30
amidon	62.50 ±0.12
cellulose	6.39%±0.03
Lignine	1.8%±0.06

V.4.2. Analyse de la composition en cendres, et de la composition en microéléments et en oligo-éléments

Les taux en cendres, en microéléments (Calcium, Magnésium) et en oligo-élément essentiels (Fer, Cuivre et Zinc) sont donnés dans le tableau N° 10.

Tableau N° 10 : Teneur en cendres et composition en microéléments et oligo-éléments

Paramètres	Teneur
Cendres (g/100g)	4.1%±0.06
Microéléments (ppm)	
- Magnésium	220,87 ±0.21
- Calcium	5,24 ±0.22
Oligo-éléments (ppm)	
- Cuivre	0.52 ±0.15
- Zinc	30.68 ±0.05
- Fer	3,19 ±0.09

Les cendres représentent 4.1 ± 0.06 g/100g du haricot niébé. Ce résultat est comparable aux résultats obtenus dans d'autres études ($3.65 \pm 0.06\%$ - 4.01 ± 0.16) (114). Le taux en cendres varie pour une même espèce en fonction des conditions agroclimatiques. Les cendres brutes correspondent à la quantité de minéraux contenus dans l'aliment. Les proportions en microéléments (Calcium et magnésium qui sont parmi les 7 minéraux les plus importants pour la santé) et en oligo-élément (Fer, cuivre et zinc qui sont parmi les principaux oligo-éléments) sont $5,24 \pm 0.22$ ppm, $220,87 \pm 0.21$ ppm, $3,19 \pm 0.09$ ppm, 0.52 ± 0.15 ppm, 30.68 ± 0.05 ppm respectivement. La composition minérale du haricot niébé varie en fonction des variétés. Les oligo-éléments sont apportés par l'alimentation en quantité suffisante si elle est équilibrée (66). Seule une petite quantité de fer, zinc et cuivre est biodisponible pour l'organisme humain (114). Plusieurs études montrent une bonne disponibilité du calcium et du magnésium (115). Cette biodisponibilité est due à la présence de chélateurs comme les fibres alimentaires et les phytates. Ils sont indispensables au déroulement de certains mécanismes métaboliques (116, 117). Ils sont potentiellement toxiques à fortes doses à cause de l'antagonisme dans l'absorption du zinc et celle du fer et du cuivre. De plus, l'excès de zinc altère les réactions immunitaires. Il est recommandé d'associer la supplémentation en Zinc avec du Cuivre et du fer particulièrement chez les végétariens afin de ne pas déséquilibrer l'homéostasie des oligo-éléments. Une concentration trop élevée en calcium provoque des effets cytotoxiques. Le magnésium est un antagoniste du calcium. Un excès de Magnésium extracellulaire ralentit l'entrée du calcium dans les cellules, car il a un effet inhibiteur sur les récepteurs N- méthyl- D – aspartate. Une quantité élevée de magnésium dans le sang provoque l'inhibition de la noradrénaline, la dopamine ou l'acétylcholine (118).

V.5. Caractérisation technologique du haricot niébé *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Les caractéristiques physiques des graines du haricot niébé sont données dans le tableau N° 11. La longueur moyenne de la graine est de 9.54 ± 0.82 mm. Le résultat est comparable à ceux obtenus par **Touami (2004) et Sellamna (2005) et par Laghetti et al (1989) (119-121)** pour des graines récoltées au niveau de la région d'El Kala-Algerie et au sud de l'Italie respectivement (longueur variant entre 5-13mm). La largeur et l'épaisseur sont respectivement de 5.9 ± 0.42 mm et 5.47 ± 0.44 mm. La taille des graines est un caractère

important qui influe sur la production et détermine la qualité des graines destinées à la commercialisation. La masse de 100 graines est de 23.06 ± 1.27 g. Ce résultat corrobore avec les observations faites par **Laghetti et al (1989) et Sellamna (2005) (120,121)**. Il est différent de celui trouvé par **Touami (2004) (119)**. Ces différences peuvent être dues à la perte d'eau durant le stockage. Le temps nécessaire pour la cuisson des graines, est de $35\text{min} \pm 4$ min. il n'affecte pas de manière significative la valeur nutritionnelle. La cuisson des graines est responsable de la gélatinisation de l'amidon et l'attendrissement des parois cellulaires. Elle est corrélée à la perméabilité à l'eau chaude des téguments. Ces derniers dépendent de la structure chimique des parois cellulaires, de la dureté des cotylédons et enfin de la taille des graines **(122)**. L'indice de gonflement des graines est de 2.29 ± 0.051 . Ce paramètre dépend de la variété et de la durée de stockage des graines et traduit la capacité des graines à absorber l'eau durant la cuisson. En effet, les graines de haricot niébé peuvent absorber des quantités d'eau variant de 1,14 à 1,60 gramme d'eau par gramme de graines **(123,124)**.

Tableau N° 11: Caractéristiques technologiques du haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp*

Paramètres	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Épaisseur (mm)	Masse de 100 graines (g)	Test de cuisson (min)	Indice de gonflement
Moyenne ± écart type	9.54 ± 0.82	5.9 ± 0.42	5.47 ± 0.44	23.06 ± 1.27	$35,66 \pm 4,04$	$2,29 \pm 0,051$

V.6. Processus de fabrication de la farine du haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp*

Le diagramme technologique mis au point pour la fabrication de la farine du haricot niébé est montré dans la Figure N° 19. Il comprend une étape de conditionnement durant laquelle, les graines sont triées, lavées et trempées dans l'eau pendant 6 h puis décortiquées par la méthode dite « voie humide ». L'enveloppe est séparée par pilage abrasif. Après cette étape réalisée dans un mortier avec un pilon, les graines sont séchées dans une étuve à 70°C pendant 12 h puis vannées. L'intérêt du séchage des graines est d'obtenir une teneur

en eau inférieure à 10%, nécessaire pour une bonne conservation et un broyage optimal. Un broyeur mécanique pourvu de cylindres métalliques tournant dos contre dent à une cadence régulière est utilisé. Après 2 passages, la farine brute obtenue est tamisée afin de séparer et d'isoler les différents produits de broyage. Le tamisage est réalisé à travers 3 tamis à ouvertures de mailles décroissantes. Le résidu issu du broyage est isolé grâce à un tamis avec une ouverture de maille 0.72mm. S'en suit la séparation de la semoule qui se fait par un tamis à ouverture de maille 0.36mm. En dernier lieu, la farine est obtenue par le tamis à ouverture de maille la plus fine de 0.28mm. Une deuxième mouture réduit la semoule obtenue en particules plus fines pour augmenter le rendement de farine.

III. 6.1 Caractérisation technologique de la farine de haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp*

Les principales propriétés de la farine du haricot niébé sont données dans le tableau N° 12. La capacité de fixation d'eau de la farine du haricot niébé est de $1,46 \pm 0,02$ g/g de matière sèche (g/gMS). Cette valeur concorde avec celles obtenues par **Akinjayeju et Bisiriyu (2004)** et **Adebooye et Singh (2008) (125,126)**. Ce paramètre est lié à la capacité de gonflement des granules d'amidon contenus dans la graine (127) et à la teneur en protéines. Plus il y a des protéines, plus la capacité de fixation d'eau augmente (128). L'interaction eau-protéine se fait au niveau des acides aminés polaires, de ce fait, la capacité de fixation d'eau est positivement corrélée avec la quantité d'acides aminés polaires. La capacité de fixation peut être améliorée par un traitement dénaturant les protéines comme la cuisson (128). L'indice de gonflement de la farine de haricot niébé est de $3,54 \pm 0,11$. Ce résultat est supérieur à ceux donnés par **Akinjayeju et Bisiriyu (2004) (124)**, et inférieur au résultat rapporté par **Abu et al. (2005) (102)**. Les teneurs en amylose dans les grains d'amidon influencent le gonflement de la farine. En effet, les grains d'amidon avec des teneurs en amylose basses sont moins rigides, et donc gonflent plus rapidement (125). La capacité de fixation d'huile de la farine de niébé est de $1,04 \pm 0,07$ g/g MS. Ce résultat est proche de celui rapporté par **Abu et al. (2005)**

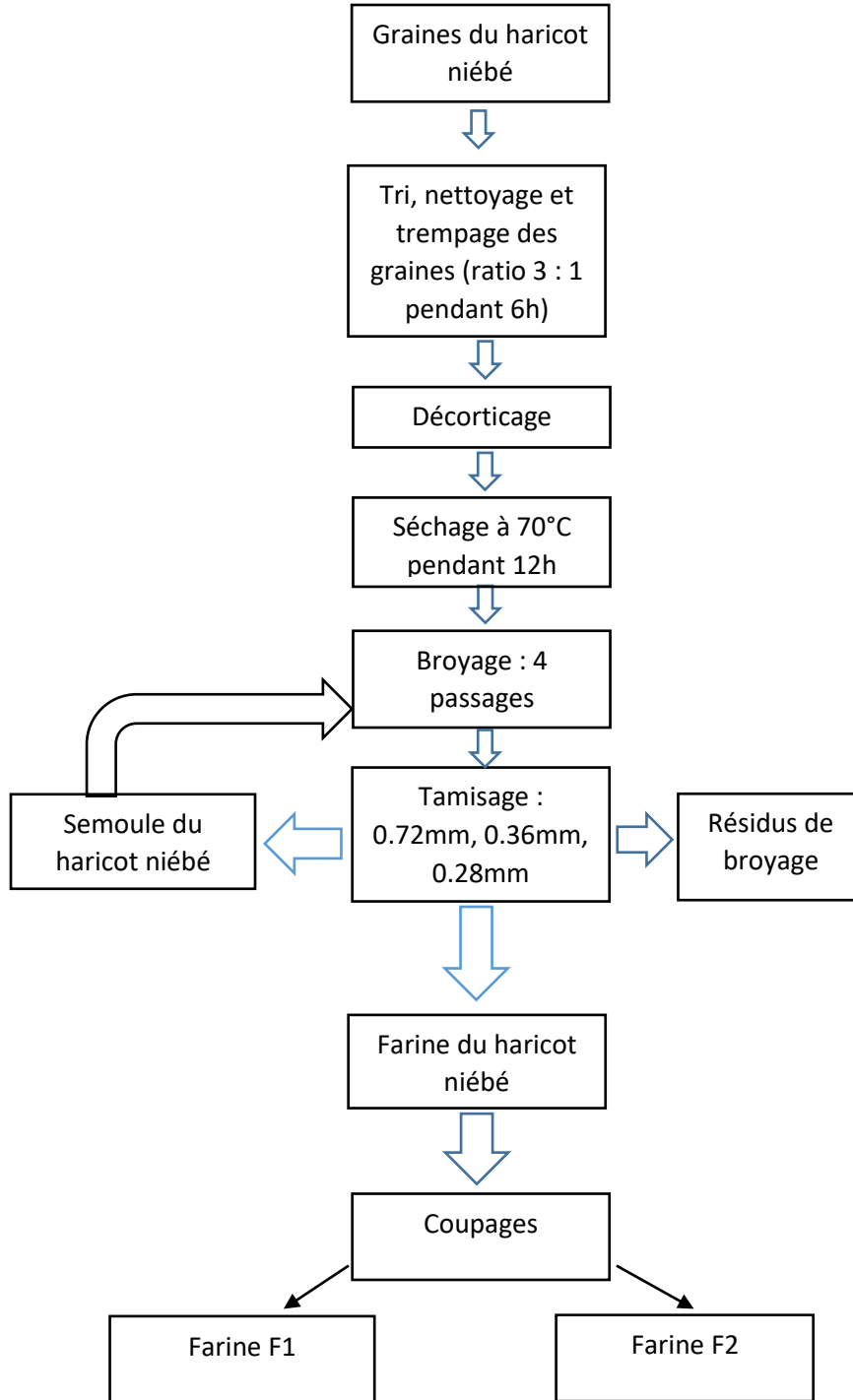


Figure N° 19: Diagramme technologique de fabrication de la farine du haricot niébé *Vigna unguiculata L.*

Walp

(102). Le mécanisme d'absorption d'huile englobe le piégeage physique d'huile par les différents constituants de l'aliment ainsi que l'affinité des fragments non polaires des protéines et les lipides. Ce paramètre est corrélé positivement avec le nombre d'acides aminés apolaire (102).

Tableau N° 12 : caractéristiques technologiques de la farine du haricot niébé *Vigna unguiculata L. Walp*

Matériel biologique	Paramètres	Moyenne±Écart-type
Farine du haricot niébé	Capacité de fixation d'eau (g/g MS)	1.46±0,02
	Indice de gonflement (mm)	3,54±0,11
	Capacité de fixation d'huile (g/g MS)	1.04±0,07

IV.6.2. Formulation et caractérisation biochimique des farines à base de haricot niébé

Les traditions culinaires de la plupart des civilisations montrent que depuis l'antiquité les hommes ont empiriquement équilibré la valeur protéique d'une alimentation carencée en protéines animales en associant céréales et légumineuses (100). L'équilibre en acides aminés apportés par cette supplémentation permet une meilleure assimilation de ceux-ci par l'organisme, il faudrait consommer approximativement 65% de céréales et 35% de légumineuses pour avoir un équilibre optimal (100). Dans la fabrication des farines à base de légumineuses, il est documenté que les ratios avec une proportion de légumineuses inférieure à 15% permettent d'obtenir des farines avec de meilleures aptitudes à la panification (95, 100). C'est en se basant sur ces données que deux formules sont proposées pour un essai de panification. Deux coupages sont réalisés en utilisant la farine du haricot niébé et les farines issues de deux céréales (maïs *Zea mays L* et riz *Oryza sativa*). Les formules proposées par l'entreprise MINY de fabrication des produits sans gluten sont des formules utilisées pour la fabrication de leurs propres produits. Dans ces formules, la farine de haricot niébé est utilisée en substitution à des farines d'autres légumineuses telles que les lentilles. La formule F1 est une

complémentation de céréales légumineuse avec un rapport massique (céréales : légumineuse) 2 :1 qui permet l'obtention d'une farine possédant une valeur nutritionnelle élevée. Pour la formule F2, le ratio céréale : légumineuse 10 : 1 est utilisé. Il permet d'obtenir une farine avec une valeur nutritionnelle correcte et des aptitudes technologiques et sensorielles améliorées (95). L'analyse biochimique (tableau N° 13) révèle que la farine F1 se caractérise par une teneur en protéines ($10.25 \pm 0,10$ g/100g contre 7.14 ± 0.66 g/100g) et une teneur en lipides (1.03 ± 0.09 g/100g contre 0.2 ± 0.03 g/100g) élevée comparée à la farine F2. Ceci est principalement dû à la présence de la farine de haricot niébé en plus grande proportion dans ce mélange. Les teneurs en amidon et en glucides totaux sont comparables dans les deux produits.

Tableau N° 13 : Teneurs en eau et composition en Macronutriments, microéléments et en oligo-éléments des farines composées des farines du haricot niébé, de maïs et de riz.

Farines	Formule F1 (ratio 2/1) Haricot niébé, Maïs, Riz, Amidon de maïs et de Féculés de pommes de terre	Formule F2 (Ratio 10/1) Haricot niébé, Maïs, Riz, Amidon de maïs et de Féculés de pommes de terre
Macronutriments (g/100g)		
Eau %	10.57%	10.26%
Protéines	$10.25 \pm 0,10$	7.14 ± 0.66
• Albumines	$3.56 \pm 0,24$	$1.56 \pm 0,63$
• Globulines	$8.56 \pm 0,43$	$5.66 \pm 0,36$
Amidon	44.74 ± 2.23	45.13 ± 1.49
Lipides	1.03 ± 0.09	0.2 ± 0.03
Cendre	1.18 ± 0.19	0.61 ± 0.06
Minéraux (ppm)		
- Magnésium	62.40 ± 0.06	36.00 ± 0.43
- Cuivre	$40,15 \pm 0,09$	$32,31 \pm 0,08$
- Calcium	19.40 ± 0.06	26.40 ± 0.11
- Fer	9.54 ± 0.02	$16,33 \pm 0.09$
- Zinc	$21,34 \pm 0,07$	$29,41 \pm 0,18$

Par contre, la teneur en cendres est plus importante dans la farine F1. Cette dernière contient une plus grande quantité de magnésium et de cuivre (62.40 ± 0.06 ppm contre 36.00 ± 0.43 ppm et $40,15 \pm 0,09$ ppm contre $32,31 \pm 0,08$), le maïs est moins riche en fer, Calcium, et zinc en comparaison avec la farine F2. La composition biochimique des formules F1 et F2 est résumée dans le tableau N° 13.

III.6.3. Essai de panification

Les pains sont évalués en fonction de leurs propriétés physiques (aspect de la croûte et de la mie, texture et consistance de la croûte et de la mie) et de leurs propriétés olfactives (odeur) et sensorielles (goût) (Tableau N° 14). Le pain issu de la farine F1 se caractérise par une croûte dorée et brillante avec une surface irrégulière et crevassée. Cette dernière est particulièrement épaisse, dure et craquante. La mie est blanche, compacte, collante et granuleuse, avec un goût désagréable (figure 20 A). Ceci peut s'expliquer par la densité en protéines et en fibres. Le pain dégage une odeur caractéristique du haricot niébé. La farine F2 se distingue par un meilleur aspect et une meilleure texture. En effet, la croûte est d'aspect doré et brillant, croquante, mais moins épaisse et cassante, ce qui facilite grandement la mastication et libère plus de goût en bouche. La mie est peu compacte, blanche, collante, friable, mais tendre et légèrement granuleuse (figure 20 B). Le goût est mieux apprécié, et reste agréable en bouche. La faible proportion de haricot niébé par rapport aux autres farines céréalières a permis l'obtention d'un pain qui répond mieux aux exigences des consommateurs tout en proposant un profil nutritionnel riche en macroéléments et microéléments. La farine de haricot niébé incorporée à de faibles ratios est préférable pour une meilleure acceptabilité gustative et sensorielle de la part des consommateurs. L'aspect des pains issus de la panification avec la farine F1 et F2 est montré dans la figure N° 20 A et N° 20 B.



Figure N° 20 : Aspect des produits de panification de la farine F1 (A) et F2 (B)

Tableau N° 14: Propriétés physiques, olfactives et gustatives des pains obtenus des farines composées du haricot niébé, de maïs, de riz, d'amidon de maïs et de féculés de pomme de terre

Farine F1 (ratio 2/1) composée de farine de haricot niébé, Maïs, Riz, Amidon de, maïs et de féculés de Pommes de terre		
Aspect		Odeur
Croûte Brillante, crevassée, dorée	Mie compacte, serrée, blanche,	Céréale
Consistance et texture		Saveur
Croûte craquante, croustillante, friable, épaisse,	Mie , collante, friable, dure, dense, granuleuse,	désagréable
Farine F2 (ratio 10/1) composée de farine de haricot niébé, Maïs, Riz, Amidon de, Maïs et de féculés de Pommes de terre		
Aspect		Odeur
Croûte brillante, marquée, dorée	Mie Peu compacte, blanche	céréale
Consistance et texture		Saveur
Croûte craquante, moins épaisse, cassante	Mie collante, friable, tendre, granuleuse,	agréable, savoureuse

Conclusion

Le haricot niébé, un aliment très courant dans l'alimentation humaine, peut être source d'allergie croisée chez des sujets génétiquement prédisposés et sensibilisés aux protéines des légumineuses, notamment les protéines de stockage des graines (globulines et albumines). L'analyse immunoprotéomique a permis l'identification de quatre nouveaux allergènes dans le haricot niébé. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines de réserve : viciline, sous unité α conglycinine, sous unité β conglycinine et albumine 2S. L'étude des réactions allergiques croisées par les tests d'inhibition ELISA, ainsi que l'étude bio-informatique d'homologie de séquence démontre une identité élevée de séquence d'acides aminés partagée entre le haricot niébé, les pois verts et les arachides. Cette réactivité croisée est médiée par des IgE dirigés contre les vicilines homologues des différentes légumineuses. D'un autre côté, l'analyse biochimique révèle que le haricot niébé constitue une source exceptionnelle de nutriments. En effet, il renferme 24.04 ± 0.49 g/100g de protéines, dont 68 % de globulines et 33 % d'albumines. L'amidon représente le principal composé énergétique, contribuant à hauteur de 62.50 ± 0.12 g/100g. La cellulose brute et la lignine s'élèvent respectivement à 6.39 ± 0.03 g/100g et 1.8 ± 0.06 g/100g. Ces fibres insolubles améliorent le transit intestinal grâce à leur capacité d'absorption d'eau. Les lipides constituent 2.10 ± 0.30 g/100g de sa composition, tandis que les cendres atteignent un niveau de $4.1\% \pm 0.06$ g/100g. En ce qui concerne, les microéléments et les oligo-éléments, le haricot niébé se distingue principalement par sa teneur en Calcium (5.24 ± 0.22 ppm) et en fer (3.19 ± 0.09 ppm). L'analyse technologique révèle que la graine de haricot niébé a une taille moyenne (9.54 ± 0.82 mm de longueur, 5.90 ± 0.42 mm de largeur et 5.47 ± 0.44 mm d'épaisseur). Sa teneur en eau (9.28 ± 0.80 g/100g) est convenable pour la conservation des graines séchées. Le temps de cuisson des graines (35.66 ± 4.04 min) n'affecte pas la valeur nutritionnelle. L'indice de gonflement qui s'élève à $2.29 \pm 0,051$ est assez bas. Le diagramme technologique mis au point (comprenant le conditionnement, la mouture et le tamisage) a permis d'isoler la farine des divers produits de mouture. Cette farine a une capacité

d'absorption d'eau de $1.46 \pm 0,02$ g/g MS et un indice de gonflement de $3.54 \pm 0,11$ mm, ce qui est faible en comparaison aux farines de blé, mais très récurrent et acceptable par rapport à une farine sans gluten. Elle se caractérise par sa faible teneur en protéines extensibles telle que le gluten. De plus, elle présente une capacité d'absorption d'huile de $1.04 \pm 0,07$ g/g MS qui lui confère la capacité d'être utilisée dans la formulation de farines destinées aux cœliaques tout en conservant et en améliorant leurs aptitudes sensorielles et nutritionnelles. Les résultats de la composition biochimique et minérale des deux formulations (F1 et F2) des farines de haricot niébé, de maïs et de riz révèlent que ces formulations contiennent respectivement 10.25 ± 0.1 g/100g (F1) et 7.14 ± 0.66 g/100g (F2) de protéines. Parmi ces protéines il est trouvé 3.56 ± 0.24 g/100g (F1) et 1.56 ± 0.63 g/100g (F2) d'albumines, ainsi que 8.56 ± 0.43 g/100g (F1) et 5.66 ± 0.36 g/100g (F2) de globulines. La formulation F1 contient 44.74 ± 2.23 g/100g d'amidon, 74.74 ± 0.16 g/100g de glucides totaux, $1.03 \pm 0.0.9$ g/100g de lipide et 1.18 ± 0.19 g/100g de cendres. Tandis que F2 contient 45.13 ± 1.49 g/100g d'amidon, 77.45 ± 0.22 g/100g de glucides, 0.2 ± 0.03 g/100g de lipides et 0.61 ± 0.06 de cendres. Les deux formulations sont riches en microéléments et oligo-éléments. La formulation F1 présente des teneurs en fer de 9.54 ± 0.02 ppm, magnésium 62.40 ± 0.06 ppm, calcium 19.40 ± 0.06 ppm, phosphore 30.40 ± 0.88 ppm, cuivre 40.15 ± 0.09 ppm, zinc 21.34 ± 0.07 ppm. Tandis que la formulation F2 contient 16.33 ± 0.09 ppm de fer, 36 ± 0.43 ppm de magnésium, 26.40 ± 0.11 ppm de calcium, 41.40 ± 0.36 ppm de phosphore, 32.31 ± 0.08 ppm de cuivre et 29.41 ± 0.18 ppm de zinc. Les différences entre les deux formulations peuvent avoir un impact sur les caractéristiques physiques et sensorielles du produit, ainsi que sur les propriétés nutritionnelles. Deux formulations de farine sans gluten sont réalisées par l'association de farine de haricot niébé avec les farines de maïs, riz, pomme de terre et d'amidon de maïs. Un agent liant (Xanthane) est ajouté comme substitut au gluten. Deux rapports massiques sont sélectionnés (F1, céréales : haricot niébé/ (2 :1) ; F2 (10 :1)) pour la réalisation des formulations. Les deux produits (F1 et F2) proposent des profils nutritionnels complets de part de leur composition en macronutriments, micronutriments et oligo-éléments, et se distinguent l'une de l'autre par leurs aptitudes technologiques et sensorielles. En effet, les essais de panifications montrent que le produit F1 permet d'obtenir un pain d'aspect brillant, doré et crevassé, avec une mie de couleur légèrement jaune et de texture

compacte. Sa consistance est caractérisée par une croûte croquante et épaisse. Une mie collante, dure et granuleuse. Ses propriétés sensorielles et olfactives sont jugées faibles puisque son goût en bouche est désagréable. Le produit F2 permet d'obtenir un pain dont la croûte est d'aspect brillant et dorée. La mie est blanche et peu compacte. Sa consistance est caractérisée par une croûte croquante, peu épaisse et légèrement cassante. Une mie collante, moelleuse et friable. Ses propriétés sensorielles et olfactives sont jugées bonnes puisque son goût est agréable et il dégage une odeur similaire à celles des pains ordinaires à base de céréales. Cette étude démontre d'une part, le potentiel allergénique du haricot niébé et sa capacité à provoquer des réactions croisées avec d'autres légumineuses comme l'arachide et les pois verts. D'autre part, elle met en lumière les qualités nutritives et sensorielles du haricot niébé qui lui ouvre droit à des applications dans l'industrie agroalimentaire, notamment comme ingrédient dans la fabrication de farines et de produits enrichis en protéines d'origine végétale destinés aux personnes souffrantes de la maladie cœliaque.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Sicherer SH, Sampson HA.** Food allergy: a review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141:41-58.
- 2- **Grabenhenrich LB, Dölle S, Moneret-Vautrin A,** et al. Anaphylaxis in children and adolescents: the European anaphylaxis registry. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:1128-1137.
- 3- **Verma AK, Kumar S, Das M, Dwivedi PD.** A comprehensive review of legume allergy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;45:30-46.
- 4- **Biana P, Faraj A, Mutungi C, Osuga I, Kuruma R.** Nutritional and technological characteristics of new cowpea (*Vigna Unguiculata*) lines and varieties grown in eastern Kenya. *Food Nutr Sci.* 2020;11:416-430
- 5- **Shakpo IO, Osundahunsi OF.** Effect of cowpea enrichment on the physico-chemical, mineral and microbiological properties of maize: cowpea flour blends. *Res J Food Sci Nutr.* 2016;1:35-41.
- 6- **Shaker MS, Wallace DV, Golden DBK, Oppenheimer J, Bernstein JA, Campbell RL, Dinakar C, Ellis A, Greenhawt M, Khan DA, Lang DM, Lang ES, Lieberman JA, Portnoy J, Rank MA, Stukus DR, Wang J.** Anaphylaxis-a 2020 practice parameter update, systematic review, and Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluation (GRADE) analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2020 Apr;145(4):1082-1123. doi: 10.1016/j.jaci.2020.01.017. Epub 2020 Jan 28. PMID: 32001253.
- 7- **Neugut AI, Ghatak AT, Miller RL.** Anaphylaxis in the United States: An Investigation Into Its Epidemiology. *Arch Intern Med.* 2001;161(1):15–21. doi:10.1001/archinte.161.1.15
- 8- **Turner PJ, Campbell DE, Motosue MS, Campbell RL.** Global Trends in Anaphylaxis Epidemiology and Clinical Implications. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Apr;8(4):1169-1176. doi: 10.1016/j.jaip.2019.11.027. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31786255; PMCID: PMC7152797.
- 9- **Samady W, Trainor J, Smith B, Gupta R.** Food-induced anaphylaxis in infants and children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2018 Sep;121(3):360-365. doi: 10.1016/j.anai.2018.05.025. Epub 2018 Jun 1. PMID: 29860051.

- 10- **Martínez San Ireneo M, Ibáñez MD, Sánchez JJ, Carnés J, Fernández-Caldas E.** Clinical features of legume allergy in children from a Mediterranean area. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Aug;101(2):179-84. doi: 10.1016/s1081-1206(10)60207-4. PMID: 18727474.
- 11- **Pascual CY, Fernandez-Crespo J, Sanchez-Pastor S, Padial MA, Diaz-Pena JM, Martín-Muñoz F, Martín-Esteban M.** Allergy to lentils in Mediterranean pediatric patients. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Jan;103(1 Pt 1):154-8. doi: 10.1016/s0091-6749(99)70539-7. PMID:
- 12- **Abu Risha M, Rick EM, Plum M, Jappe U.** Legume Allergens Pea, Chickpea, Lentil, Lupine and Beyond. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2024 Sep;24(9):527-548. doi: 10.1007/s11882-024-01165-7. Epub 2024 Jul 11. PMID: 38990406; PMCID: PMC11364600.
- 13- **Smits M, Le TM, Welsing P, Houben G, Knulst A, Verhoeckx K.** Legume Protein Consumption and the Prevalence of Legume Sensitization. *Nutrients.* 2018 Oct 19;10(10):1545. doi: 10.3390/nu10101545. PMID: 30347643; PMCID: PMC6213573.
- 14- **Halima O, Najjar FZ, Wahab A, Gamagedara S, Chowdhury AI, Foster SB, Shaheen N, Ahsan N.** Lentil allergens identification and quantification: An update from omics perspective. *Food Chem (Oxf).* 2022 Apr 12;4:100109. doi: 10.1016/j.fochms.2022.100109. PMID: 35495776; PMCID: PMC9043643.
- 15- **Patil SP, Niphadkar PV, Bapat MM.** Chickpea: a major food allergen in the Indian subcontinent and its clinical and immunochemical correlation. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001 Aug;87(2):140-5. doi: 10.1016/S1081-1206(10)62209-0. PMID: 11527247.
- 16- **Gupta RS, Warren CM, Smith BM, et al.** Prevalence and Severity of Food Allergies among US Adults. *JAMA Netw Open.* 2019;2(1):e185630. doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.5630
- 17- **Bartha I, Almulhem N, Santos AF.** Feast for thought: A comprehensive review of food allergy 2021-2023. *J Allergy Clin Immunol.* 2024 Mar;153(3):576-594. doi: 10.1016/j.jaci.2023.11.918. Epub 2023 Dec 12. PMID: 38101757; PMCID: PMC11096837.
- 18- **Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C.** The prevalence of food allergy:

- a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Sep;120(3):638-46. doi: 10.1016/j.jaci.2007.05.026. Epub 2007 Jul 12. PMID: 17628647.
- 19- **Warren CM, Jiang J, Gupta RS.** Epidemiology and Burden of Food Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2020 Feb 14;20(2):6. doi: 10.1007/s11882-020-0898-7. PMID: 32067114; PMCID: PMC7883751.
- 20- **Dalal I, Binson I, Reifen R, Amitai Z, Shohat T, Rahmani S, Levine A, Ballin A, Somekh E.** Food allergy is a matter of geography after all: sesame as a major cause of severe IgE-mediated food allergic reactions among infants and young children in Israel. *Allergy.* 2002;57:362–365 32.
- 21- **Moneret-Vautrin DA, Guérin L, Kanny G, Flabbee J, Frémont S, Morisset M.** Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 04(4 Pt 1):883–8 33.
- 22- **Reis AM, Fernandes NP, Marques SL, Paes MJ, Sousa S, Carvalho F, Conde T, Trindade M.** Lupine sensitisation in a population of 1,160 subjects. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2007; 35:162–3 34.
- 23- **Hieta N, Hasan T, Mäkinen-Kiljunen S, Lammintausta K.** Lupin allergy and lupin sensitization among patients with suspected food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009;103:233–7
- 24- **Gayraud J, Mairesse M, Fontaine J F, Thillay A, Leduc V, Rancé F, Parisot L, Moneret-Vautrin D A.** The prevalence of sensitization to lupin flour in France and Belgium: a prospective study in 5366 patients, by the allergy vigilance network. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2009; 41:17–22 36.
- 25- **Peeters K A, Koppelman S J, Penninks A H, Lebens A, Brujnzeel-Koomen C A, Hefle S L, Taylor S L, van Hoffen E, Knulst A C.** Clinical relevance of sensitization to lupine in peanut sensitized adults. *Allergy.* 2009; 64:549–55 37.
- 26- **Patil S P, Niphadkar P V, Bapat M .** Chickpea: a major food allergen in the Indian subcontinent and its clinical and immunochemical correlation. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2001; 87:140–145 38.

- 27- **Martinez M, Ibanez M D, Fernandez Caldas E.** Hypersensitivity to members of the botanical order Fabales (legumes). *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2000; 10:187–199 39.
- 28- **Crespo JF, Pascual C, Burks AW, Helm R M, Esteban M.** Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol.* 1995 ; 6:39–43.
- 29- **Boughellout H, Khangui A, Khellassi N.L, Kheroufi A, Mouzai A, Zidoune M.N.** Prévalence de l'allergie alimentaire chez une population âgée de 0 à 15 ans de la ville de Skikda Algérie, *Revue Française d'Allergologie*, Volume 63, Issue 3, 2023 ; 103357, ISSN 1877-0320,
- 30- **Abdellaziz G, Malki HD .**Prévalence des allergies alimentaires chez les enfants et adolescents scolarisés dans la région ouest de la Wilaya d'Alger R. *Abstracts / Revue française d'allergologie.* 2014 ; (41)227–232
- 31- **Sekfali L , Boucenna H , Benmaouche S , Belaid B , Brahimi G, Laid Y, Smail N, Ddjidjik R , Benhala KN.** Allergie alimentaire chez les enfants de moins de 5 ans: Apport de l'exploration allergologique. *Revue Algérienne d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 2022 ;2543–3555
- 32- **Sampson H A, Aceves S, Bock S A, et al.** Food allergy: A practice parameter update-2014. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(5):1016-1025.
- 33- **Boyce J A, Assa'ad A, Burks A W, et al.** Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(6):1105-1118.
- 34- **Sicherer SH, Wood RA, Vickery BP, et al.** The natural history of egg allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):492-499.
- 35- **Nowak-Wegrzyn A, Assa'ad AH, Bahna S L, et al.** Work Group report: Oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;365-383.
- 36- **Astwood J D, Leach J N, Fuchs R L.** Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol.* 1996;14:1269–73 46.
- 37- **Ferreira F.** Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy.* 2006; 61(4):461–76

- 38- **Costa J, Villa C, Verhoeckx K, Cirkovic-Velickovic T, Schrama D, Roncada P, Rodrigues PM, Piras C, Martín-Pedraza L, Monaci L, Molina E, Mazzucchelli G, Mafra I, Lupi R, Lozano-Ojalvo D, Larré C, Klueber J, Gelencser E, Bueno-Diaz C, Diaz-Perales A, Benedé S, Bavaro SL, Kuehn A, Hoffmann-Sommergruber K, Holzhauser T.** Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Animal Allergens? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2022 Feb;62(1):1-36. doi: 10.1007/s12016-020-08826-1. Epub 2021 Jan 7. PMID: 33411319.
- 39- **Berin MC, Sampson HA.** (2013) Food allergy: an enigmatic epidemic. *Trends Immunol* 34:390–397. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.04.003> - DOI - PubMed - PMC.
- 40- **Guerin, B., Guerin, L.**L'arachide.L'une des principales sources d'allergènes alimentaires. *Rev. fr. Allergol.*1995, 35, 39-43.
- 41- **Souci, S.W.** Food composition and nutrition table. Medpharm Scientific publications Ref Type: Journal (Full) . - 1994.
- 42- **Guéant, J.L., Moutété, F., Olszewski, A., Pons, L., Gustin, I., Moneret-Vautrin, D.A.** Allergie à l'arachide et à l'huile d'arachide. *Rev. fr. Allergol.* 1995, 35, 312-319.
- 43- **Blanc, F.**Developpement d'un modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Applications à l'étude des allergènes du lait et de l'arachide, et évaluation de l'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité de Ara h1. Thèse de doctorat : BioInfoFrance : AgroParisTech, 2008, 267p.
- 44- **Burks A, Cockrell G, Connaughton C, Karpas A, Helm RM.** Epitope specificity of the major peanut allergen, Ara h II. *J Allergy Clin Immunol.* 1995, 95, 607-611.
- 45- **Burks A, Williams L, Helm R, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T.** Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J Allergy Clin Immunol.* 1991, 88, 172-179.

- 46- **Koppelman SJ, Kno, EF, Vlooswijk RA, Wensing M, Knulst AC, Hefle S.L, Gruppen H, Piersma S.** Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy*. 2003, 58, 1144-1151.
- 47- **Bublin M, Breiteneder H.** Cross-reactivity of peanut allergens. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Apr;14(4):426. doi: 10.1007/s11882-014-0426-8. PMID: 24554241; PMCID: PMC3962743.
- 48- **Kleber-Janke T, Cramer R, Appenzeller U, Schlaak M, Becker WM.** Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999 Aug;119(4):265-74. doi: 10.1159/000024203. PMID: 10474031.
- 49- **Flinterman AE, van Hoffen E, den Hartog Jager CF, Koppelman S, Pasmans SG, Hoekstra MO, Bruijnzeel-Koomen CA, Knulst AC, Knol EF.** Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time. *Clin Exp Allergy*. 2007 Aug;37(8):1221-8. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02764.x. PMID: 17651153.
- 50- **Rabjohn P, Helm EM, Stanley JS, West CM, Sampson HA, Burks AW, Bannon GA.** Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(4):535-42. doi: 10.1172/JCI5349. PMID: 10021462; PMCID: PMC408104.51
- 51- **Osborne TB, Campbell F.** Proteins of lentils. *Journal of the American Chemical Society*. 1898, 20, 362.
- 52- **Joshi M, Adhikari B, Aldred P, Panozzo JF, Kasapis S, Barrow CJ.** Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chem*. 2012 Oct 1;134(3):1343-53. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.029. Epub 2012 Mar 15. PMID: 25005952.
- 53- **Joshi M, Adhikari B, Aldred P, Panozzo JF, Kasapis S.** Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. *Food Chemistry*. 2011, 129, 1513–1522.
- 54- **Sanchez-Monge R, Lopez-Torrejón G, Pascual CY, Varela J, Martin-Esteban M, Salcedo G.** Vicilin and convicilin are potential major allergens from pea. *Clin Exp Allergy*. 2004 Nov;34(11):1747-53. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02085.x. PMID: 15544600.

- 55- **Bogdanov IV, Shenkarev ZO, Finkina EI, Melnikova DN, Rumynskiy EI, Arseniev AS, Ovchinnikova TV.** A novel lipid transfer protein from the pea *Pisum sativum*: isolation, recombinant expression, solution structure, antifungal activity, lipid binding, and allergenic properties. *BMC Plant Biol.* 2016 Apr 30;16:107. doi: 10.1186/s12870-016-0792-6. PMID: 27137920; PMCID: PMC4852415.
- 56- **Jappe U, Karstedt A, Warneke D, Hellmig S, Böttger M, Riffelmann FW, Treudler R, Lange L, Abraham S, Dölle-Bierke S, Worm M, Wagner N, Ruëff F, Reese G, Knulst AC, Becker WM.** Identification and Purification of Novel Low-Molecular-Weight Lupine Allergens as Components for Personalized Diagnostics. *Nutrients.* 2021 Jan 28;13(2):409. doi: 10.3390/nu13020409. PMID: 33525401; PMCID: PMC7911308.
- 57- **Goggin DE, Mir G, Smith WB, Stuckey M, Smith PM.** Proteomic analysis of lupin seed proteins to identify conglutin Beta as an allergen, *Lup an 1.* *J Agric Food Chem.* 2008 Aug 13;56(15):6370-7. doi: 10.1021/jf800840u. Epub 2008 Jul 12. PMID: 18620408
- 58- **Patricia, F.** Influence de procédés industriels sur l'allergénicité des aliments. Thèse de doctorat: Biologie cellulaire et Nutrition. Nancy: Université Henti Poincaré-Nancy I, 2008, 157p.
- 59- **Wilson S, Blaschek K, de Mejia EG.** Allergenic proteins in soybean: Processing and reducing of P34 allergenicity . *Nutrition Reviews.* 2005, 63, 47–58.
- 60- **Mujoo R, Trinh DT, Perry KW.** Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chemistry.* 2003, 82, 265–273
- 61- **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.
- 62- **Kamath SD, Bublin M, Kitamura K, Matsui T, Ito K, Lopata AL.** Cross-reactive epitopes and their role in food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2023 May;151(5):1178-1190. doi: 10.1016/j.jaci.2022.12.827. Epub 2023 Mar 15. PMID: 36932025.

- 63- **Sharma E, Vitte J.** A systematic review of allergen cross-reactivity: Translating basic concepts into clinical relevance. *J Allergy Clin Immunol Glob.* 2024 Feb 19;3(2):100230. doi: 10.1016/j.jacig.2024.100230. PMID: 38524786; PMCID: PMC10959674.
- 64- **Bublin M, Breiteneder H.** Cross-reactivity of peanut allergens. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014 Apr;14(4):426. doi: 10.1007/s11882-014-0426-8. PMID: 24554241; PMCID: PMC3962743.
- 65- **Mastrorilli C, Chiera F, Arasi S, Giannetti A, Caimmi D, Dinardo G, Gracci S, Pecoraro L, Miraglia Del Giudice M, Bernardini R.** On behalf of the Diagnostic Commission of the Italian Society of Pediatric Allergy and Immunology (SIAIP). IgE-Mediated Legume Allergy: A Pediatric Perspective. *Journal of Personalized Medicine.* 2024; 14(9):898. <https://doi.org/10.3390/jpm14090898>
- 66- **Mabdoua S.** Caractérisation physico-chimique de quelques populations de niébé (*Vigna unguiculata L. Walp.*) influence des traitements. Mémoire de Magister en Phytotechnie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Algérie. 2001 ; 83p.
- 67- **Mahdjoub S, Mougdad A.** Réponse morph-physiologique de Niébé (*Vigna Unguiculata(L.) Walp.*) au déficit hydrique et salin en conditions contrôlée. Mémoire de master en biotechnologie végétale. UNIVERSITE KASDI MERBAH. 2022 ; 96p.
- 68- **Abdou m, Foulaf S.** Etude du comportement de quelques variétésde niébé ou *Tadellagh* (*Vigna unguiculata L.*) sous serre et sous une conduite écologique. Mémoire de master en sciences agronomiques. Université Ahmed Draïa Adrar. 2020.
- 69- **Timko MP, Ehlers JD, Roberts PA.** *Pulses, Sugar and Tuber Crops. Cowpea.* (2007) 49- 67. doi:10.1007/978-3-540-34516-9-3
- 70- **Carvalho M, Carnide V, Sobreira C, Castro I, Coutinho J, Barros A, Rosa E.** Cowpea Immature Pods and Grains Evaluation: An Opportunity for Different Food Sources. *Plants* (Basel). 2022 Aug 9;11(16):2079. doi: 10.3390/plants11162079. PMID: 36015383; PMCID: PMC9416070.

- 71- **Singh BB, Ajeigbe HA, Tarawal SA, Fernandez-rivera S, Abubakar M.** (2003). Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. *Field Crop Res.* 84:169–177. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00148-5)
- 72- **Gómez C.** Cowpea: Post Harvest Operations, Post-harvest Compendium, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2004. Rome, Italy.
- 73- **Bressani, R.** Nutritive Value of Cowpea. In: Singh, S.R. and Rachies, K.O., Eds., *Cowpea Research Production and Utilization*, John Wiley and Sons, New York, (1985) USA, 353-360.
- 74- **Iqbal A, Khalil IA, Ateeq N, Khan MS.** Nutritional quality of important food legumes, *Food Chemistry*, Volume 97, Issue 2, 2006, Pages 331-335, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.011>.
- 75- **Uzogara SG, Morton ID, Daniel JW.** Processing, Microstructural and Nutritional Changes in Cowpeas (*Vigna unguiculata*) Cooked in Kanwa Alkaline Salt. In: *Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods Quality and Nutrition*, Dares Salaam, 3-5 November 1992, 18.
- 76- **Gonçalves A, Goufo P, Barros A, Domínguez-Perles R, Trindade H, Rosa EA, Ferreira L, Rodrigues M.** Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *J Sci Food Agric.* 2016 Jul;96(9):2941-51. doi: 10.1002/jsfa.7644. Epub 2016 Mar 1. PMID: 26804459.
- 77- **Thangadurai D.** Chemical Composition and Nutritional Potential of *Vigna unguiculata* ssp. *Cylindrica* (Fabaceae). *Journal of Food Biochemistry.* (2005), 29, 88-98. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00014.x>
- 78- **Adebooye C, Singh V.** Physico-chemical properties of the flours and starches of two cowpea varieties (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp). *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 2008; 9, 92–100

- 79- **Gerrano AS, Jansen van Rensburg WS, Adebola PO.** Nutritional composition of immature pods in selected cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. genotypes in South Africa. Australian Journal of Crop Science. 2017, Vol. 11 (02), pp. 134-141, <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.02.p72>.
- 80- **Mamiro PS, Mbwaga AM, Mamiro DP, Mwanri AW, Kinabo JL.** Nutritional Quality and Utilization of Local and Improved Cowpea Varieties in Some Regions in Tanzania. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development. 2011, 11, 4490-4506. <https://doi.org/10.4314/ajfand.v11i1.65876>
- 81- **Nnanna IA, Phillips RD.** Amino-acid composition protein-quality and water-soluble vitamin content of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*). Plant Foods for Human Nutrition. 1989, Vol. 39, pp. 187-200, <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF01091899.pdf>.
- 82- **Devi CB, Kushwaha A, Kumar A.** Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). J Food Sci Technol. 2015 Oct;52(10):6821-7. doi: 10.1007/s13197-015-1832-1. Epub 2015 Apr 14. PMID: 26396436; PMCID: PMC4573095.
- 83- **Akinyele IO, Akinlosotu A.** Effect of soaking, dehulling and fermentation on the oligosaccharides and nutrient content of cowpeas (*Vigna unguiculata*). Food Chemistry. 1991. Vol. 41, pp. 43-53.
- 84- **Onyenekwe PC, Njoku GC, Ameh DA.** Effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) processing methods on flatus causing oligosaccharides. Nutrition Research. 2000, Vol. 20, pp. 349-358,
- 85- **Phillips RD, Abbey BW.** Composition and flatulence-producing potential of commonly eaten Nigerian and American legumes. Food Chemistry. 1989, Vol. 33, pp. 271-280,
- 86- **Aguilera Y, Díaz MF, Jiménez T, Benítez V, Herrera T, Cuadrado C, Martín-Pedrosa M, Martín-Cabrejas MA.** Changes in nonnutritional factors and antioxidant activity during germination of nonconventional legumes. J Agric Food Chem. 2013 Aug 28;61(34):8120-5. doi: 10.1021/jf4022652. Epub 2013 Aug 19. PMID: 23909570.
- 87- **Akpapunam MA, Achinewhu SC.** Effects of cooking, germination and fermentation on the chemical-composition of nigerian cowpea (*Vigna unguiculata*). Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition. 1985. Vol. 35, pp. 353-358,

- 88- **Phillips, R.D.** Cowpea Processing and Products”, in Dry Beans and Pulses Production, Processing and Nutrition, Blackwell Publishing Ltd. 2012. pp. 235-259,
- 89- **Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK.** Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res.* 1982;28:1-92. doi: 10.1016/s0065-2628(08)60110-x. PMID: 6299067.
- 90- **Thompson LU, Yoon JH.** Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science.* 1984. Vol. 49, pp. 1228-1229.
- 91- **Egounlety M , Aworh OC.** Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa Harms*)”, *Journal of Food Engineering.* 2003. Vol. 56, pp. 249-254.
- 92- **Kochhar N, Walker A, Pike DJ.** Effect of variety on protein-content, amino-acid composition and trypsin-inhibitor activity of cowpeas. *Food Chemistry.* 1988. Vol. 29, pp. 65-78.
- 93- **Zhang J, Shi J, Ilic S, Jun Xue S, Kakuda Y.** Biological Properties and Characterization of Lectin from Red Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris*). *Food Reviews International.* (2008). 25(1), 12–27. <https://doi.org/10.1080/8755912080245811594>
- 94- **Rao D, Tamanam Rao, Kotilingam d, Athota K R.** Isolation and characterization of allergens from the seeds of *Vigna sinensis*. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand.* 2000; 18. 9-14.
- 95- **Affrifah N S , Phillips R D , Saalia F K.** Cowpeas: Nutritional profile, processing methods and products—A review. *Legume Science.* 2022; 4(3), e131.
- 96- **Fotso M, et al.** Molecular heterogeneity of Cowpea (*Vigna unguiculata Fabaceae*) seed storage proteins. *Pl Syst Evol.* 1994 ; **191**, 39–56.
- 97- **Patterson S P, McWatters K H , Hung Y, Chinnan S. Phillip R D.** Physicochemical properties and consumer acceptability of akara (fried paste) made from three cowpea cultivars. *Food Res. Int.* 2002; 35 (7): 691 – 8.

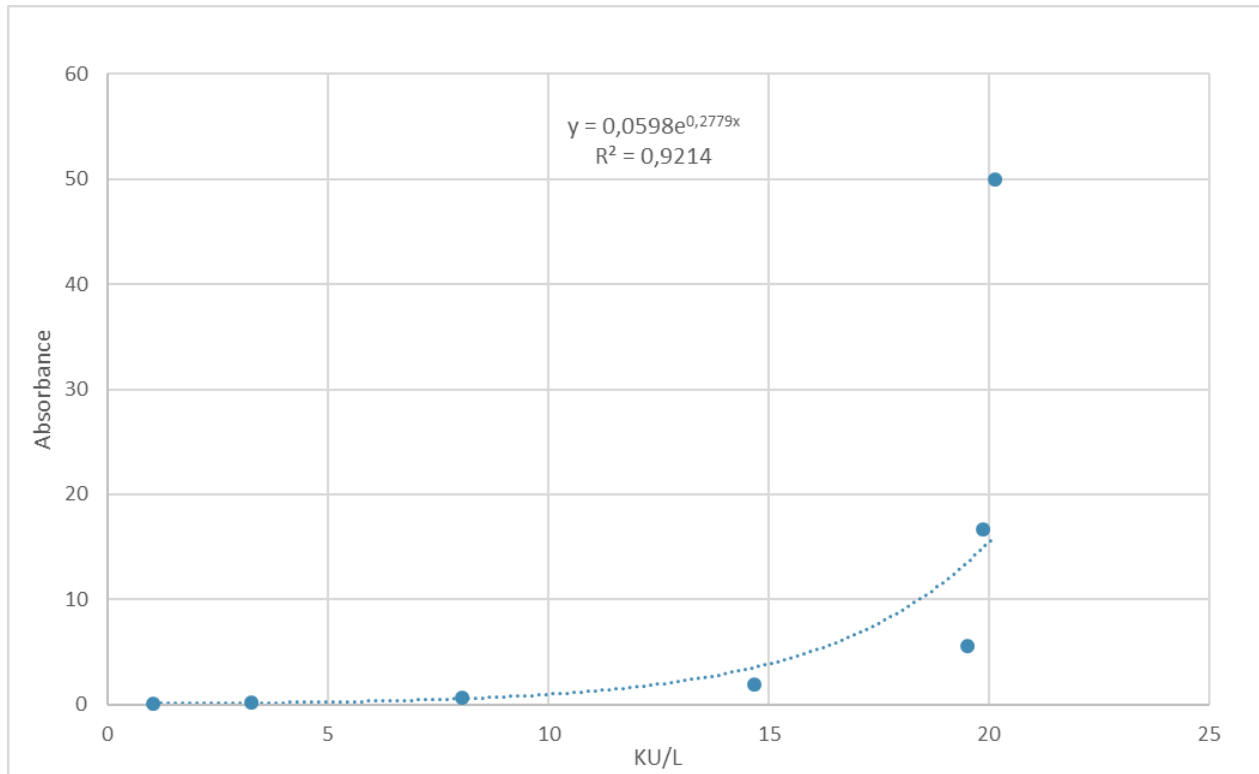
- 98- **McWatters K H, Chinnan MS, Phillips RD, Beuchat LR, Reid LB, Mensa-Wilmot YM.** Functional, nutritional, mycological, and akara-making properties of stored cowpea meal. *J Food Sci.* 2002; 67 (6): 2229 – 2234.
- 99- **de Souza Ferreira E, Capraro J, Sessa F, Magni C, Demonte A, Consonni A, Augusto Neves V, Maffud Cilli E, Duranti M, Scarafoni A.** New molecular features of cowpea bean (*Vigna unguiculata, l. Walp*) β -vignin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2018 Feb;82(2):285-291. doi: 10.1080/09168451.2017.1419855. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29338640..
- 100- **LAPPE F.** Diet for a Small Planet. 10th anniversary edition, Ballantine Books. New York, 1982 : 230 p
- 101- **Giami SY.** Compositional and Nutritional Properties of Selected Newly Developed Lines of Cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*). *Journal of Food Composition and Analysis.* 2005; 18, 665-673.
- 102- **Abu J O, Muller K, Duodu KG, Minnaar A.** Functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) flours and pastes as affected by γ -irradiation. *Food Chemistry.* 2005; 93, 103–1.
- 103- **Wensing M, Knulst A C, Piersma S, O’Kane F, Knol E F, Koppelman S J.** Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:420-424.
- 104- **Boye Auguste Denise B.M., Edwige Salomé Y.S., Boni Clovis K.N., Jacob K.N., Charlotte TD, Faustin SD, Kouadio BE, Gogbeu SJ, Koutoua AKY..** Etude De La Qualité Agronomique Et Biochimique De Quelques Variétés De Niébé (*Vigna unguiculata (L) Walp* (Fabaceae) Provenant De La Côte d’Ivoire. *European Scientific Journal,* 2016 ;12. 362. 10.19044
- 105- **Hamid S, Muzzafar S, Wani I A, Masoodi F A.** Physicochemical and functional properties of two cowpea cultivars grown in temperate Indian climate,” *Cogent Food & Agriculture.* 2015; 1: 1099418.

- 106- **Chinma C E, Alemede I C, Emelife I G.** Physicochemical and Functional Properties of Some Nigerian Cowpea Varieties,” Pakistan Journal of Nutrition. 2008; 7, (1), pp. 186-190,
- 107- **Freitas R, Ferreira L, Teixeira A. R.** Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; **52**, 1682–1687.
- 108- **Kumaraguru Vasagam K P, Balasubramanian T, Venkatesan R.** Apparent digestibility of differently processed grain legumes, cow pea and mung bean in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius and associated histological anomalies in hepatopancreas and midgut. *Animal Feed Science and Technology*. 2007; 132, 250–266
- 109- **Butt M S, Batool R.** Nutritional and Functional Properties of Some Promising Legumes Protein Isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2010; 9 (4), 373-379
- 110- **Amir Y, Haenni A L, Youyou A.** Differences in the biochemical composition of dry legumes cultivated in north Algeria. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 5 (3), 1411-1418.
- 111- **Siddiq M, avi R , Harte J B, Dolan K .** Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT - Food Science and Technology*. 2010; 43, 232–237.
- 112- **Aune D, Chan D S, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T.** Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2011;10;343:d6617.
- 113- **Gianfredi V, Salvatori T, Villarini M, Moretti M, Nucci D, Realdon S.** Is dietary fibre truly protective against colon cancer? A systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr*. 2018; 69(8):904-915.
- 114- **Boclé, J C, Champ M, Berta J L.** Les fibres alimentaires: déterminants physico-chimiques, définition, aspects analytiques et physiologiques. *Cahiers de nutrition et de diététique*. 2005 ;40(1), 15-21
- 115- **Baudin B.** Déficits nutritionnels en oligo-éléments, *Revue Francophone des Laboratoires*. 2021 ; Issue 533,2021,Pages 25-32.

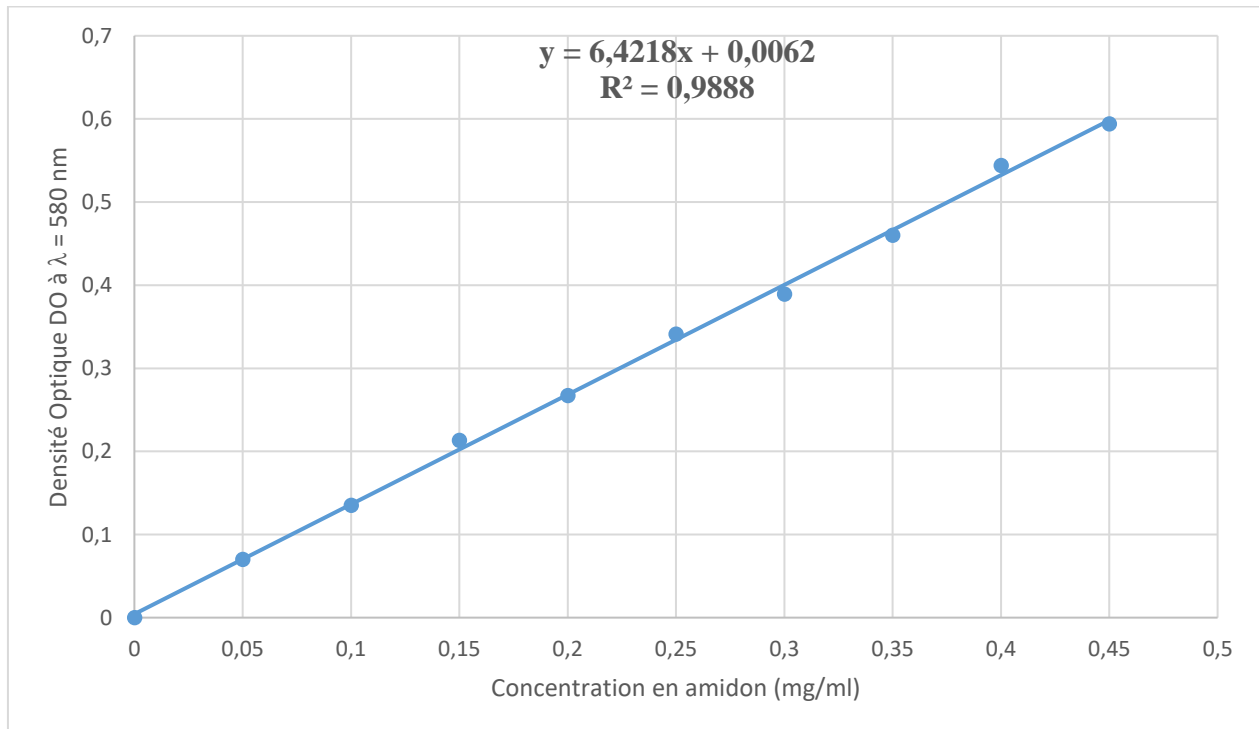
- 116- **Patrice F.** Calcium, magnésium et eaux minérales naturelles. Cahiers de Nutrition et de Diététique. 2015 ; 50. S22-S29.
- 117- **Davis SR, Cousins RJ.** Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. J Nutr. 2000 ;(5):1085-8.
- 118- **van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P.** New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. Biochim Biophys Acta. 2014; 1843(10):2253-62.
- 119- **Touami N.** Caractérisation agro morphologique de quelques populations de *Vigna unguiculata* L. provenant de la région d'El Kala. Mémoire d'Ingénieur, INA, El Harrach, Alger. 2004 ;70p.
- 120- **Sellamna K,** Caractérisation agromorphologique de quelques populations locales du *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Mémoire d'ngénieur, INA, EL Harrach, Alger. 2005 ; 61p.
- 121- **Laghetti G, Padulosi S, Hammer K, Cifarelli S. Perrino P.** Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Germplasm collection in southern Italy and preliminary evaluation. In: Genetic Resources . 1989; 200p.
- 122- **Uzogara S G, Morton I D , Daniel J W.** Processing, microstructural and nutritional changes in cowpeas (*Vigna Unguiculata*) cooked in kanwa alkaline salt. In: Traditional African foods quality and nutrition. Proceedings of a regional workshop Dar Es Salaam, Tanzania. Ed.: International foundation for science (IFS) 1992.
- 123- **Olapade A, Okafor GI, Ozumba AU, Olatunji O.** Characterization of common Nigerian cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) varieties. Journal of Food Engineering. 2002; 55, 101–105.
- 124- **Kaptso K G, Njintang Y , Komnek A E, Hounhouigan J, Scher J .**Physical properties and rehydration kinetics of two varieties of cowpea (*Vigna Unguiculata*) and bambara groundnuts (*Voandzeia subterranea*) seeds. Journal of Food Engineering. 2008; 86, 91–99.
- 125- **Akinjayeju O, Bisiriyu K T.** Comparative studies of some properties of undehulled mechanically dehulled an manually dehulled cowpea (*Vigna unguiculata* Walp. L.) flours. International Journal of Food Science and Technology. 2004;39,355-360.

- 126- **Adebooye C, Singh V.** Physico-chemical properties of the flours and starches of two cowpea varieties (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2008; 9, 92–100
- 127- **Prinyawiwatkul W, McWatters K H, Beuchat L R, Phillips R D.** Changes in fatty acid, simple sugar, and oligosaccharide content of cowpea (*Vigna Unguiculata*). 1996.
- 128- **Hutton C, Campbell A.** Water and fat absorption. In *Protein Functionality in Foods*, Ed. :Cherry, J. P, American Chemical Society. 1982; 177-200.

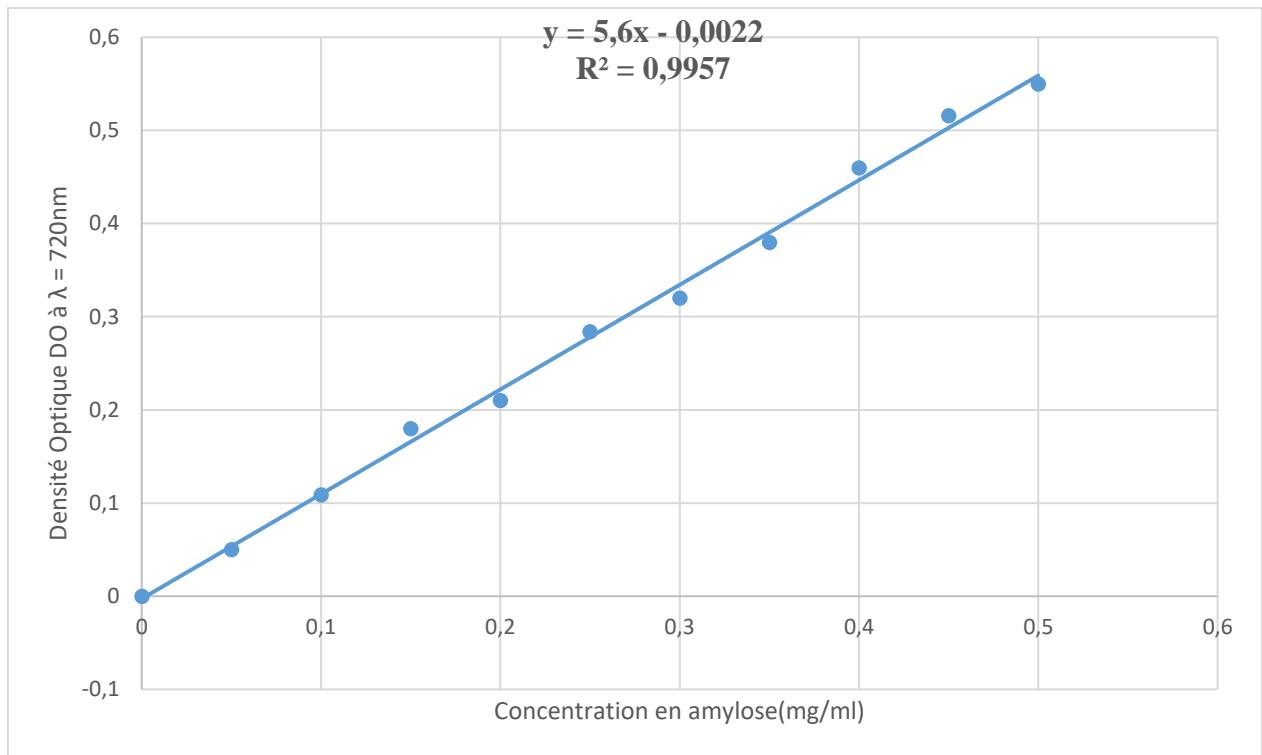
ANNEXE



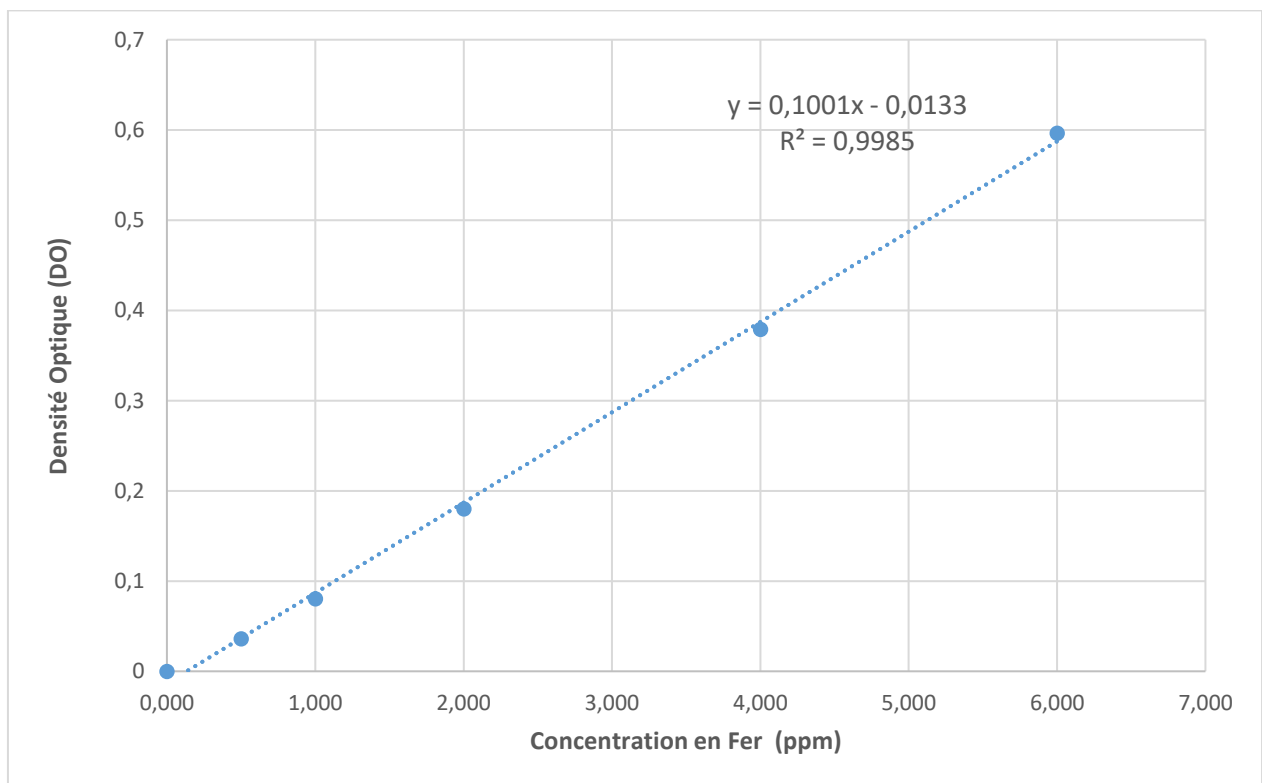
Annexe N° 1: Courbe standard de dosage des IgE spécifiques à l'albumine sérique de chat Fel d 2



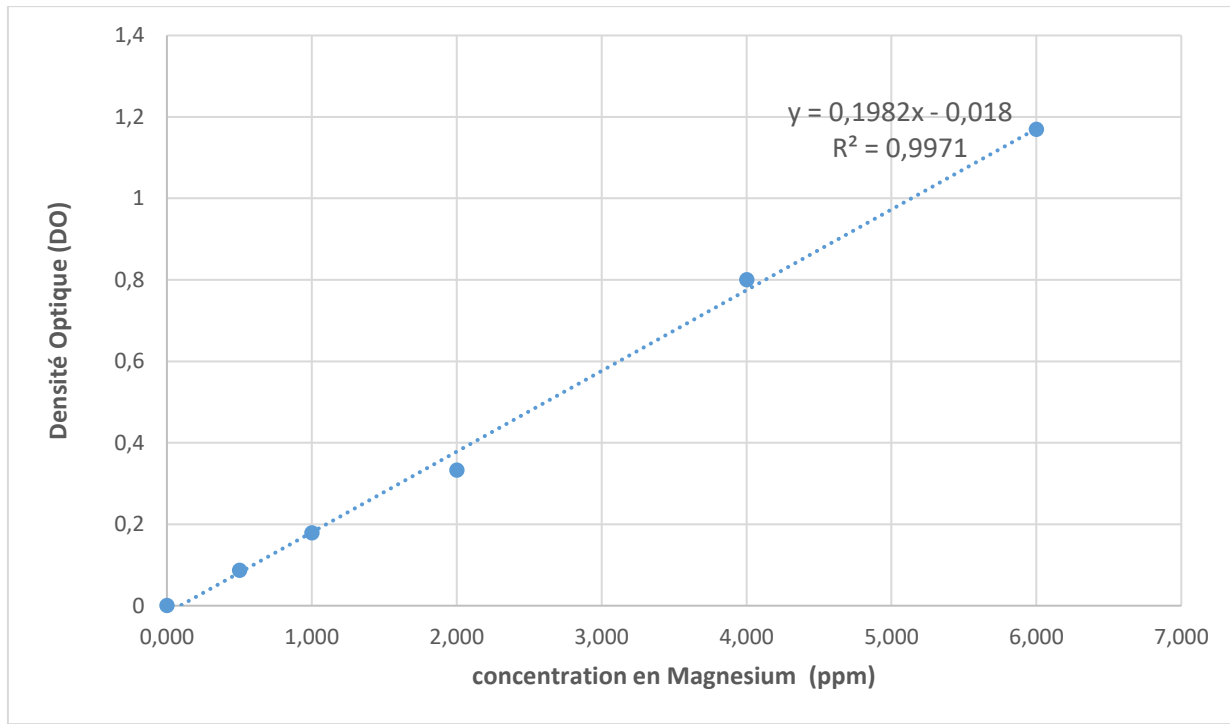
Annexe N° 2: Courbe standard de dosage de l'amidon total



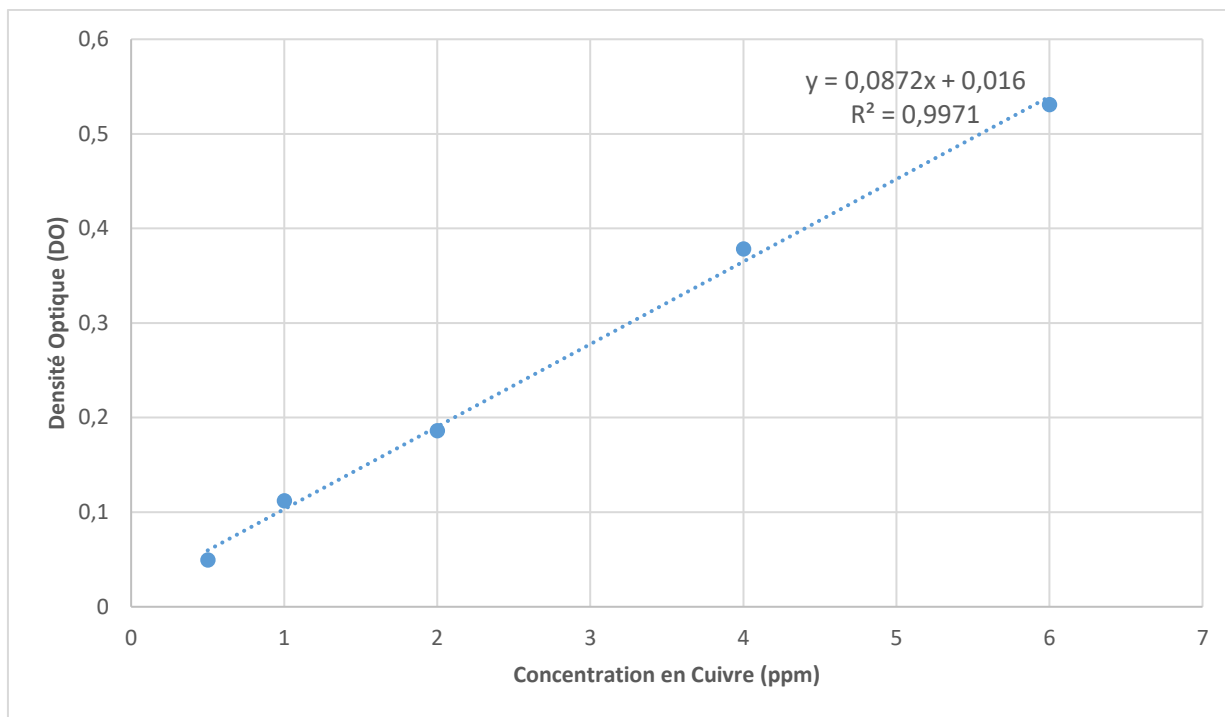
Annexe N° 3: courbe standard de dosage de l'amylose



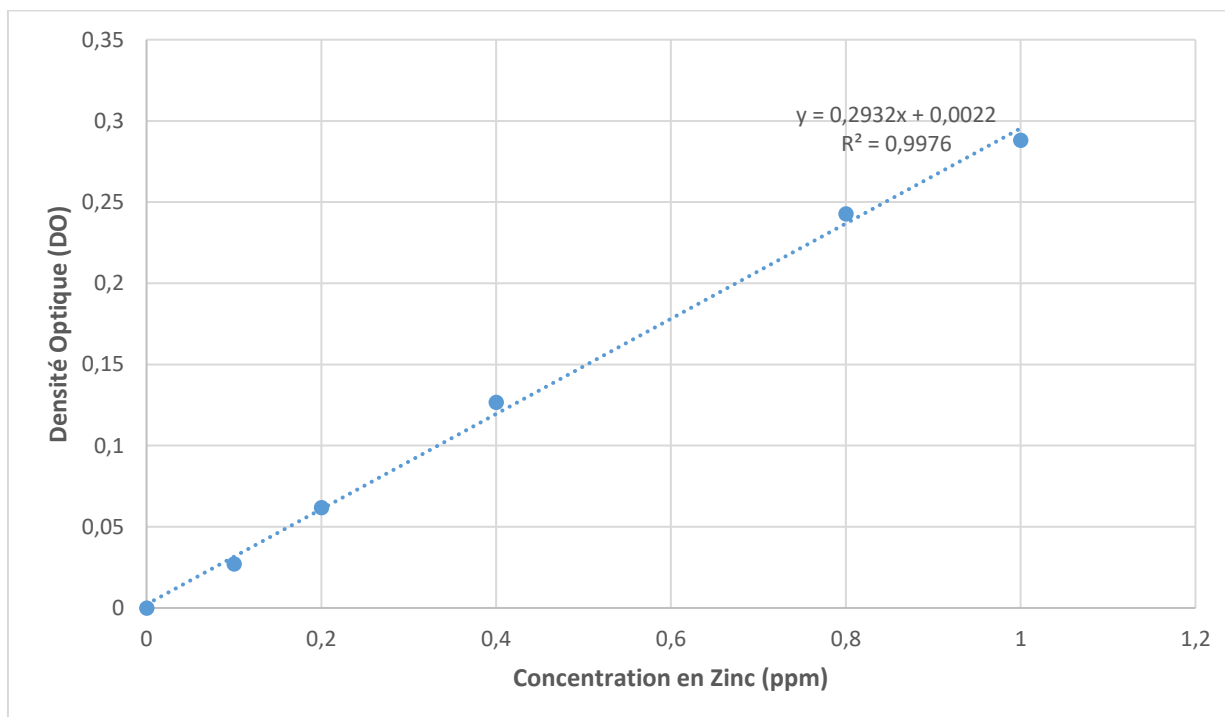
Annexe N° 4: Courbe standard de dosage du fer par Spectrométrie d'Absorption Atomique



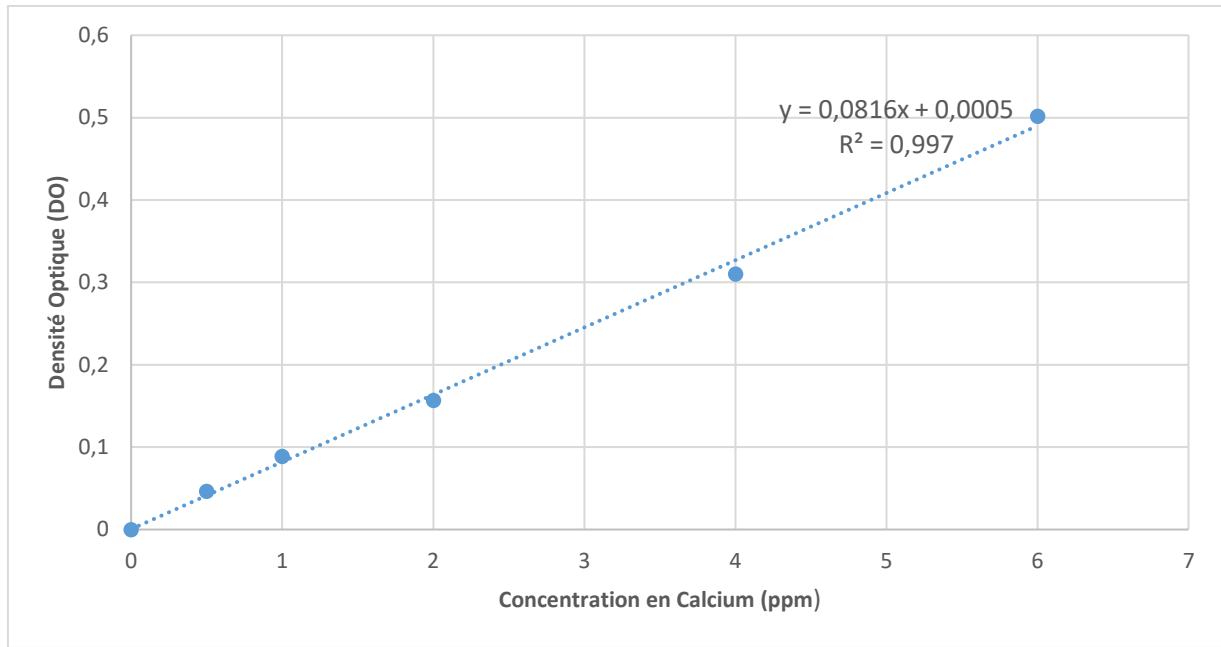
Annexe N° 5: Courbe standard de dosage du Magnésium par Spectrométrie d'Absorption Atomique



Annexe N° 6: Courbe standard de dosage du Cuivre par Spectrométrie d’Absorption Atomique



Annexe N° 7 : Courbe standard de dosage du Zinc par Spectrométrie d’Absorption Atomique



Annexe N° 8 : Courbe standard de dosage du Calcium par spectrométrie d'Absorption Atomique