

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

## Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Sciences Alimentaires

Thème

---

### Traitement par Détente Instantanée Contrôlée ou Micro-ondes des protéines de blé: Incidences sur les propriétés structurales, fonctionnelles et l'immunoréactivité du gluten

---

Présentée par : **MAHROUG Hamida**

Soutenue le : 14 /01/ 2021

Devant le Jury composé de

Président :	<b>ZIDOUNE Mohammed Nasreddine</b>	Professeur	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C. 1
Rapporteur :	<b>BENATALLAH Leila</b>	Professeur	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C. 1
Co-Rapporteur :	<b>IGREJAS Gilberto</b>	Professeur associé avec agrégation	Université de Trás-os-Montes et Alto Douro U.T.A.D, Vila Real-Portugal
Examineurs :	<b>BOUTEBBA Aissa</b>	Professeur	Université Badji Mokhtar-Annaba
	<b>BOUGHELLOUT Halima</b>	M.C.A.	I.N.A.T.A.A. U.F.M.C. 1
	<b>SOUIKI Lynda</b>	Professeur	Université 8 Mai 1945-Guelma

## Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Nutrition et de Technologies Agroalimentaires (LNTA) à l'I.N.A.T.A.A. Université Frères Mentouri de Constantine 1 UFMC1, l'Unité de Génomique et Protéomique Fonctionnelles et le centre de recherche de chimie à l'Université de Trás-os-Montes et Alto Douro U.T.A.D-Vila Real-Portugal.

Mes chaleureux remerciements vont à Mme Benatallah Leila, directrice de thèse, pour sa confiance, sa patience, son dynamisme, sa sympathie et pour son dévouement. Je la remercie aussi, de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès nationaux et internationaux.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr Gilberto Igerjas, co-directeur de thèse, de m'avoir accueilli dans l'Unité de Génomique et Protéomique Fonctionnelles, qui m'a beaucoup soutenu durant mon travail.

Mes sincères remerciements à Mr Fernando M. Nunes qui m'a accueilli dans le centre de recherche de chimie et de sa précieuse collaboration, sans oublier Miguel Ribeiro, chercheur permanent post-doc à UTAD, grâce à qui j'ai pu acquérir des compétences expérimentales et avancer dans mes recherches.

Je suis honorée par Mr Zidoune Mohammed Nasreddine, qui a accepté de présider mon jury, je le remercie pour ses conseils et son orientation.

Tout mes remerciements à Mr Boutebba Aissa, mon encadrant de mémoire de Magister, avec qui j'ai beaucoup appris tant sur le plan théorique que pratique.

Je remercie Mme Boughellout Halima et Mme Souiki Lynda de leur participation à ce travail et leur aide tant sur le plan humain que scientifique.

Je remercie profondément Monsieur ALLAF Karim et Mme Colette Besombes, professeurs à l'Université de la Rochelle, et Monsieur Larbi Rhazi pour leur collaboration, et Mme Mariana Fernandes, professeur à UTAD, qui m'a aidé pour le traitement des résultats.

Je remercie Mme Ana Maria Calderon de la Barca, professeur au centre de recherche de développement et alimentation au Mexique, pour ses conseils.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à Dr Douadi Hamane, propriétaire du laboratoire d'analyses privé Ibn Sina Constantine.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Professeur Bouab Haroune, Médecin immunologue à l'HMRU Constantine, Krisztina Tackas, chercheuse Hongroise à l'Institut de recherche de science alimentaire à Budapest et Dr Benachour, médecin immunologue à l'Université 3 de Constantine, pour leur collaboration.

Je remercie Mr Abderrahmani Nazim, et Messieurs Bouzid Faycel et Kenida Yacine, fournisseurs des équipements et réactifs chimiques, pour leur aide.

Je tiens également à remercier mes chers amis et collègues : Bourekoua Hayat, Djeghim Fairouz, Chikoune Anis, Laib Imen, Fettouhi Aouatif, Dib Ahlam, Rachedi Kounouz, Derouiche Meriem , Bahchachi Nora, Kadi Hanene et Achou Lydia pour leur disponibilité et leur encouragement.

Je remercie Mr el HadeF el Okki, Dr Bechtarzi, Dr Bouziane et Pr Boudjeaada , chef de département de physique, pour leur aide.

Je remercie mes chères amies Asma Boukria, Mouellef Adra, Mounia Fergani, Mahnane Wahiba et Bouhalit Samira pour leur encouragement et leur soutien. Je remercie les chercheurs portugais pour leur chaleureux accueil et leur aide Vanessa Silva, Joao Smith, Myriem Taghouti, Telma Sousa, Carolina Sabença, Vania Santos, Sandrine Ferreira, Juliana Milheiro, Daniela Ferreira, Felix Luis, Carolina Rodrigues et Anicia Gomes.

## Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

mes très chers parents,

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance, de longs jours d'apprentissage. Votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et pour prospérer dans la vie. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

mes sœurs et mon Frère,

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mes adorables neveux et nièces qui m'ont bien soutenu, mais à leurs façon, j'aurais peut être fini ce travail bien avant.

# Table des matières

<b>Liste des publications et des communications</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Code des acides aminés</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Revue bibliographique</b>	
<b>Chapitre 1. Gluten de blé et ses propriétés fonctionnelles</b>	
1.1. Définition.....	4
1.2. Composition chimique.....	4
1.3. Classification des protéines du gluten.....	4
1.3.1. Gliadines.....	5
1.3.2. Gluténines.....	5
1.4. Propriétés fonctionnelles du gluten.....	6
1.4.1. Viscoélasticité et extensibilité.....	6
1.4.2. Propriétés moussantes.....	7
1.4.3. Propriétés émulsifiantes.....	7
1.4.4. Propriétés de formation des gels.....	8
1.4.5. Propriétés de formation des films.....	8
<b>Chapitre 2. Pathologies liées au gluten</b>	
2.1. Maladie cœliaque.....	11
2.1.1. Définition.....	11
2.1.2. Facteurs de risque de la maladie cœliaque.....	11
2.1.2.1. Facteurs génétiques.....	11
2.1.2.2. Facteurs environnementaux.....	12
2.1.3. Symptômes.....	12
2.1.4. Epitopes impliqués dans la maladie cœliaque.....	14
2.1.5. Physiopathologie.....	17
2.1.6. Diagnostic.....	18
2.1.6.1. Diagnostic sérologique.....	19
2.1.6.2. Diagnostic histologique.....	19
2.1.6.3. Régime sans gluten.....	19
2.1.6.4. Typage HLA de classe II.....	19
2.2. Sensibilité au gluten non cœliaque.....	19
2.2.1. Définition.....	19
2.2.2. Symptômes.....	20
2.2.3. Physiopathologie.....	20
2.2.4. Diagnostic.....	21
2.3. Allergie au blé.....	22
2.3.1. Définition.....	22
2.3.2. Symptômes.....	22
2.3.3. Allergènes de blé.....	22
2.3.4. Physiopathologie.....	23
2.3.5. Diagnostic.....	25
2.4. Traitements des pathologies liées au gluten.....	26
<b>Chapitre 3. Méthodes de détoxification du gluten</b>	
3.1. Méthodes physiques.....	27

3.1.1. Micro-ondes.....	27
3.1.2. Lumière pulsée .....	28
3.2. Méthodes enzymatiques .....	28
3.3. Méthodes combinées.....	30
3.3.1. Méthodes chimio-enzymatiques.....	30
3.3.2. Méthodes physique, chimique et mécanique.....	30

## **Matériel et méthodes**

1. Matières premières.....	34
1.1. Farine de blé tendre.....	34
1.2. Gluten de blé.....	35
1.2.1. Gluten fabriqué.....	35
1.2.2. Gluten commercial.....	35
1.3. Pains à base de blé.....	35
1.4. Sérums sanguins.....	35
2. Etude des effets de la DIC sur les protéines du gluten de blé.....	36
2.1. Caractérisation physicochimiques de la farine et du gluten de blé .....	36
2.1.1. Teneur en eau.....	36
2.1.2. Teneur en matière grasse libre.....	37
2.1.3. Teneur en protéines totales.....	37
2.1.4. Teneur en cendres.....	38
2.2. Caractérisation rhéologique de la farine de blé tendre.....	38
2.3. Application du traitement DIC.....	39
2.3.1. Définition de la DIC.....	39
2.3.2. Appareillage.....	40
2.3.3. Fonctionnement.....	41
2.3.4. Conditions de l'application du traitement DIC.....	42
2.4. Séparation des protéines du gluten par SDS-PAGE.....	43
2.5. Séparation des protéines du gluten par électrophorèse bidimensionnelle.....	44
2.6. Détermination des propriétés rhéologiques.....	45
2.7. Détermination de la teneur en groupements thiols libres.....	45
2.8. Détermination de la structure secondaire par FTIR.....	46
2.9. Détermination des propriétés fonctionnelles.....	47
2.9.1. Détermination de la solubilité.....	47
2.9.2. Détermination de la capacité émulsifiante.....	47
2.9.3. Détermination de la capacité moussante.....	48
2.10. Evaluation de l'immunoréactivité par ELISA Indirect.....	48
2.11. Digestion enzymatique et évaluation de l'immunoréactivité par ELISA R5 compétitif.....	49
3. Etude des effets du traitement Micro-ondes sur les protéines du gluten de blé.....	51
3.1. Application du traitement Micro-ondes.....	51
3.1.1. Définition des Micro-ondes.....	51
3.1.2. Appareillage.....	52
3.1.3. Fonctionnement du four à Micro-ondes.....	53
3.1.4. Conditions de l'application du traitement Micro-ondes.....	53
3.2. Mesure de la température du gluten après traitement Micro-ondes.....	54
3.3. Mesure de la teneur en eau après traitement Micro-ondes.....	54
3.4. Séparation des protéines du gluten par SDS-PAGE.....	55
3.5. Quantification des protéines du gluten par HPLC-RP.....	55
3.6. Détermination des propriétés rhéologiques.....	56

3.7. Détermination de la teneur en groupements thiols libres.....	56
3.8. Détermination de la structure secondaire par FTIR.....	56
3.9. Séparation des protéines du gluten par AFFFF.....	57
3.10. Détermination de l'extractibilité des protéines du gluten par SEC.....	60
3.11. Digestion enzymatique et évaluation de l'immunoréactivité par ELISA R5 compétitif.....	61
4. Analyse statistique.....	61

## Résultats et discussion

1. Caractéristiques de la farine de blé tendre.....	62
1.1. Caractéristiques physicochimiques.....	62
1.1.1. Teneur en eau.....	62
1.1.2. Teneur en matière grasse libre.....	62
1.1.3. Teneur en protéines totales.....	62
1.1.4. Teneur en cendres.....	63
1.2. Caractéristiques rhéologiques.....	63
1.2.1. Travail de déformation.....	64
1.2.2. Indice de gonflement.....	64
1.2.3. Rapport de configuration.....	64
2. Caractéristiques physicochimiques du gluten de blé.....	64
2.1. Teneur en eau.....	64
2.2. Teneur en matière grasse libre.....	65
2.3. Teneur en protéines.....	65
2.4. Teneur en cendres.....	65
3. Effets de la DIC sur les protéines du gluten de blé.....	65
3.1. Ajustement du modèle.....	65
3.2. Effet de la DIC sur la structure primaire.....	66
3.3. Effet de la DIC sur les groupements thiols libres et les propriétés rhéologiques.....	68
3.4. Effet de la DIC sur la structure secondaire.....	71
3.5. Effet de la DIC sur les propriétés fonctionnelles.....	75
3.6. Effet de la DIC sur l'immunoréactivité des anticorps IgA antigliadines.....	78
3.7. Effet de la DIC sur la quantité des épitopes potentiellement toxiques du gluten de blé et des pains à base de blé.....	81
3.7.1. Ajustement du modèle.....	81
3.7.2. Effet de la DIC sur les épitopes potentiellement toxiques du gluten.....	82
3.7.3. Effet de la DIC sur les épitopes potentiellement toxiques des pains à base de blé.....	83
4. Effets du traitement Micro-ondes sur les protéines du gluten de blé.....	85
4.1. Ajustement du modèle.....	85
4.2. Effet du traitement Micro-ondes sur la température maximale atteinte.....	86
4.3. Effet du traitement Micro-ondes sur la teneur en eau.....	87
4.4. Effet du traitement Micro-ondes sur la structure primaire.....	88
4.5. Effet du traitement Micro-ondes sur l'extractibilité des protéines du gluten.....	90
4.6. Effet du traitement Micro-ondes sur les propriétés rhéologiques du gluten et les groupements thiols libres.....	91
4.7. Effet du traitement Micro-ondes sur la structure secondaire.....	94
4.8. Effet du traitement Micro-ondes sur les caractéristiques macromoléculaires des polymères.....	96
4.9. Effet du traitement Micro-ondes sur la solubilité des protéines du gluten dans le SDS.....	98
4.10. Effet du traitement Micro-ondes sur les épitopes potentiellement toxiques du	

gluten.....	100
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>102</b>
<b>Références bibliographique .....</b>	<b>104</b>
<b>Valorisation scientifique</b>	
<b>Annexes</b>	



## Liste des publications et des communications

### Publications

**Mahroug, H., Ribeiro, M., Rhazi, L., Bentallah, L., Zidoune, M. N., Nunes, F. M., & Igrejas, G.** (2019). How microwave treatment of gluten affects its toxicity for celiac patients? A study on the effect of microwaves on the structure, conformation, functionality and immunogenicity of gluten. *Food chemistry*, 297, 124986.

**Mahroug, H., Benatallah, L., Takács, K., Bouab, H., Zidoune, M. N., & Allaf, K.** (2020). Impact of Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Treatment on Chemical, Functional and Immunological Properties of Wheat Gluten. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(2), 575-586.

### Communications nationales et internationales

**Mahroug, H., Benatallah, L., Zidoune, M. N., & Allaf, K.** (2017). Impact de la Détente Instantanée Contrôlée DIC sur la toxicité du gluten de blé. Journées Francophones de Nutrition JFN. Nantes-France.

**Mahroug, H., Ribeiro, M., Benatallah, L., Zidoune, M. N., Allaf, K., & Igrejas, G.** (2017). Evaluation de l'immunoreactivité de trois types de pain traités par la Détente Instantanée Contrôlée (DIC). 1<sup>ère</sup> Journée Nationale sur la Nutrition et la Sécurité Alimentaire JNNSA. Batna-Algérie.

**Mahroug, H., Bentallah, L., Besombes, C., Allaf, K., Ribeiro, M., Igrejas, G., Nunes, F. M., & Zidoune, M. N.** (2018). Gluten et maladie coéliquaie : effet du traitement DIC sur les épitopes toxiques des protéines de blé. Séminaire International sur les sciences alimentaires (SISA). INATAA. Constantine-Algérie.

**Mahroug, H., Ribeiro, M., Nunes, F. M., Benatallah, L., Zidoune, Mohammed M.N., & Igrejas, G.** (2020). Impact of microwave treatment on immunoreactivity, primary and secondary structure of wheat gluten.II. International Agricultural, Biological & Life Science Conference, Edirne, Turkey, 2020

## Liste des abréviations

<b>AAG</b>	Anticorps anti-gliadine
<b>AATG</b>	Anticorps anti-transglutaminase
<b>Ac</b>	Anticorps
<b>AFFFF</b>	Fractionnement par Flux de Force Asymétrique
<b>Ag</b>	Antigène
<b>APS</b>	Ammonium Persulfate (Persulfate d'Ammonium)
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ATIs</b>	Inhibiteurs d'Alpha-Amylase et de Trypsine (Alpha-amylase Trypsine inhibitors)
<b>BSA</b>	Albumine de Sérum Bovin
<b>β-ME</b>	β Mercaptoethanol
<b>CE</b>	Capacité Emulsifiante
<b>CCD</b>	Composite Central Design (Plan Composite Central)
<b>CHAPS</b>	3-[(3-Cholamidopropyl) Dimethylammonio]-1-Propanesulfonate Hydrate
<b>CM</b>	Capacité Moussante
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice de l'Antigène
<b>D I C</b>	Détente Instantanée Contrôlée
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis Acide 2-Nitrobenzoïque
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra Acétique
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>EMA</b>	Endomysium
<b>EPP</b>	Protéine Polymérique Extractible
<b>Ext</b>	Extensibilité totale
<b>FODMAPS</b>	Fermentescible Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols (Oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides et polyols fermentescibles)
<b>FTIR</b>	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
<b>G</b>	Gluten
<b>GHz</b>	Giga hertz
<b>Glii</b>	Gliadine non extractible
<b>Glis</b>	Gliadine extractible
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen (Antigènes des leucocytes humains)
<b>HPLC-RP</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase inversée
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase (Peroxydase de raifort)
<b>IAA</b>	IodoAcétamide
<b>IL</b>	Interleukine
<b>J</b>	Joule
<b>LIE</b>	Lymphocytes Intra-Epithéiaux
<b>MALS</b>	Multi Angle Light Scattering (Diffusion Dynamique de la lumière)
<b>MC</b>	Maladie Cœliaque
<b>MHz</b>	Mega hertz

<b>MFB</b>	Myofibroblaste
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>MO</b>	Micro-ondes
<b>MSR</b>	Méthodologie de Surface de Réponse
<b>ms</b>	Milli seconde
<b>OGM</b>	Organisme génétiquement modifié
<b>Pa</b>	Pascal
<b>PBST</b>	Phosphate Buffered Saline with Tween (Tampon Phosphate Salin Tween)
<b>PEP</b>	Propyl Endopeptidase
<b>PF</b>	Pain à base de farine de blé tendre
<b>ppm</b>	partie par million
<b>RCT</b>	Récepteur des cellules T
<b>Rmax</b>	Résistance maximale à l'extension
<b>RSG</b>	Régime sans gluten
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate De Sodium
<b>SDS-PAGE</b>	Électrophorèse Sur Gel De Polyacrylamide En Présence De Dodécylsulfate De Sodium
<b>SEC</b>	Chromatographie d'Exclusion Stérique
<b>SG-FPM</b>	Sous Unités Gluténines De Faible Poids Moléculaire
<b>SG-HPM</b>	Sous Unités Gluténines De Haut Poids Moléculaire
<b>SGNC</b>	Sensibilité au Gluten Non Cœliaque
<b>TCA</b>	Acide Trichloracétique
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor (Récepteur de type Toll)
<b>TPP</b>	Protéine Polymérique Totale
<b>Tr</b>	Tours
<b>Tris</b>	Trisaminométhane
<b>t-TG</b>	Transglutaminase Tissulaire
<b>UPP</b>	Protéine Polyémrique non extractible
<b>UR</b>	Unité Relative
<b>W</b>	Watt

## Code des acides aminés

---

Acide aminé	Abréviation 3-Lettres	Abréviation 1 -Lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Aspartate	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

---

Liste des figures

Figure N°	Titre	Page
<b>Figure 1.</b>	Classification des protéines du gluten	4
<b>Figure 2.</b>	Pathologies liées au gluten	10
<b>Figure 3.</b>	Coupe transversale de la muqueuse intestinale	11
<b>Figure 4.</b>	Iceberg de la maladie cœliaque	13
<b>Figure 5.</b>	Physiopathologie de la maladie cœliaque	17
<b>Figure 6.</b>	Stratégie diagnostique de la maladie cœliaque	18
<b>Figure 7.</b>	Physiopathologie de la sensibilité au gluten non cœliaque	21
<b>Figure 8.</b>	Physiopathologie de l'allergie immédiate	24
<b>Figure 9.</b>	Schéma général de la thèse	32
<b>Figure 10.</b>	Schéma d'un plan d'expérience composite centré à deux facteurs et cinq niveaux	33
<b>Figure 11.</b>	Courbe d'Alvéographe Chopin	39
<b>Figure 12.</b>	Schéma d'un réacteur de la DIC	40
<b>Figure 13.</b>	Étapes du traitement DIC	41
<b>Figure 14.</b>	Courbe du test de la rhéologie	45
<b>Figure 15.</b>	Courbe d'étalonnage pour le dosage des épitopes toxiques par ELISA R5 compétitif	51
<b>Figure 16.</b>	Quelques régions de spectre électromagnétique	51
<b>Figure 17.</b>	Représentation schématique d'une onde électromagnétique	52
<b>Figure 18.</b>	Schéma d'un four à Micro-ondes domestique	52
<b>Figure 19.</b>	Étapes de la séparation des molécules par Fractionnement par Flux de Force Asymétrique	58
<b>Figure 20.</b>	Cellule de Fractionnement par Flux de Force Asymétrique	59
<b>Figure 21.</b>	Profils électrophorétiques des protéines des glutens témoin et traités par la DIC	67
<b>Figure 22.</b>	Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la teneur en groupement thiols libres des protéines du gluten de blé	69
<b>Figure 23.</b>	Inaptitude des glutens traités par la DIC à la réhydratation	70
<b>Figure 24.</b>	Expansion, rigidité et brunissement des échantillons du gluten après traitement DIC	74
<b>Figure 25.</b>	Surface de réponse de l'effet du traitement DIC sur la solubilité des protéines du gluten de blé	75
<b>Figure 26.</b>	Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la capacité émulsifiante des protéines du gluten de blé	76
<b>Figure 27.</b>	Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la capacité moussante des protéines du gluten de blé	77
<b>Figure 28.</b>	Effet de la DIC sur l'immunoréactivité des anticorps anti-gliadines cœliaques (AGAs)	79
<b>Figure 29.</b>	Immunoréactivité de l'anticorps R5 avec les glutens traités par la DIC et le gluten témoin mesurée après digestion peptique et trypsique	82
<b>Figure 30.</b>	Immunoréactivité de l'anticorps R5 avec le pain à base de farine traité par la DIC et le pain non traité mesurée après digestion peptique et trypsique	83

<b>Figure 31.</b>	Surface de réponse de l'effet de la DIC sur les épitopes toxiques potentiels du pain à base de semoule de blé dur	84
<b>Figure 32.</b>	Surface de réponse de l'effet de la DIC sur les épitopes toxiques potentiels du pain commercial	84
<b>Figure 33.</b>	Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur la température atteinte	87
<b>Figure 34.</b>	Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur la teneur en eau	88
<b>Figure 35.</b>	Profils électrophorétiques des protéines des glutens témoin et traités par Micro-ondes	89
<b>Figure 36.</b>	Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur l'extractibilité des gliadines	90
<b>Figure 37.</b>	Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur la résistance maximale à l'extension	91
<b>Figure 38.</b>	Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur l'extensibilité totale	92
<b>Figure 39.</b>	Teneurs en groupements thiols libres du gluten témoin et glutens traités par Micro-ondes	93
<b>Figure 40.</b>	Profil de chromatographie d'exclusion de taille du gluten témoin à 214 nm	98
<b>Figure 41.</b>	Immunoréactivité de l'anticorps R5 avec glutens traités par Micro-ondes et gluten témoin mesurée après digestion peptique et trypsique	100

**Liste des tableaux**

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1.</b>	Épitopes toxiques	14
<b>Tableau 2.</b>	Épitopes immunogènes	16
<b>Tableau 3.</b>	Allergènes impliqués dans les réactions allergiques médiées par les IgE	23
<b>Tableau 4.</b>	Efficacité du régime sans gluten	26
<b>Tableau 5.</b>	Matrice du plan composite centré à deux facteurs et cinq niveaux	34
<b>Tableau 6.</b>	Caractéristiques cliniques et sérologiques des malades cœliaques diagnostiqués	36
<b>Tableau 7.</b>	Niveaux expérimentaux des deux variables indépendantes des plans expérimentaux composites centrés de la DIC	42
<b>Tableau 8.</b>	Matrice du premier plan expérimental composite centré du traitement DIC	42
<b>Tableau 9.</b>	Matrice du deuxième plan expérimental composite centré du traitement DIC	43
<b>Tableau 10.</b>	Niveaux expérimentaux des deux variables indépendantes du plan expérimental composite centré du traitement Micro-ondes	53
<b>Tableau 11.</b>	Matrice du plan expérimental composite centré du traitement Micro-ondes	54
<b>Tableau 12.</b>	Caractéristiques rhéologiques de la farine de blé tendre étudiée	63
<b>Tableau 13.</b>	Coefficients de régression pour les surfaces de réponse des glutens de blé traités par la DIC	66
<b>Tableau 14.</b>	Pourcentages des composants de la structure secondaire des glutens témoin et traités par la DIC déterminés par spectroscopie FTIR	72
<b>Tableau 15.</b>	Coefficients de régression pour les surfaces de réponse des glutens de blé et des différents types de pain traités par la DIC	81
<b>Tableau 16.</b>	Coefficients de régression pour les surfaces de réponse des glutens de blé traités par Micro-ondes	86
<b>Tableau 17.</b>	Pourcentages des composants de la structure secondaire des glutens témoin et traités par Micro-ondes déterminés par spectroscopie FTIR	95
<b>Tableau 18.</b>	Caractéristiques des polymères des glutens témoin et traités par Micro-ondes	97
<b>Tableau 19.</b>	Extractibilité des protéines du gluten après traitement Micro-ondes	99

# *Introduction générale*



## **Introduction générale**

Le blé est la deuxième céréale la plus produite dans le monde, connue pour son adaptabilité, ses rendements élevés et sa valeur nutritive. Dans plusieurs régions, y compris l'Afrique du Nord, le blé et ses dérivés sont considérés comme des aliments de base et leur production et leur consommation continuent à augmenter avec la croissance démographique et l'urbanisation accrue (Riba *et al.* , 2010 ; Zaidi *et al.* , 2018). Les protéines du grain de blé ont été classées par Osborne en quatre types selon leur solubilité : les albumines, solubles dans l'eau, les globulines, solubles dans les solutions salines, les gliadines, solubles dans les alcools, et les gluténines, solubles dans l'acide acétique. Ces deux dernières forment un complexe protéique appelé le gluten (Bonilla *et al.* , 2020). Les protéines du gluten représentent un coproduit important de l'industrie de l'amidon de blé, du point vue économique. Le gluten vital de blé est utilisé principalement dans le domaine de la boulangerie grâce à ses propriétés viscoélastiques uniques résultant de la formation, après hydratation, d'un réseau tridimensionnel interconnecté par des liaisons disulfures (Ribeiro *et al.* , 2015). Ses applications dans l'industrie Agro-Alimentaire est en augmentation en raison de sa disponibilité et son faible coût d'une part (Agyarea *et al.* ,2009 ; Zhang *et al.* 2011). D'autre part, ses autres propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, l'émulsification des graisses, la gélification et la formation des mousses ont également conduit à de nombreuses applications. En effet, les protéines du gluten sont souvent utilisées dans la préparation de sauce de soja et dans les produits carnés et de purées de fruits (Zhang *et al.* ,2015 ; Ortolan et Steel, 2017).

En dépit de l'omniprésence des protéines du gluten de blé dans notre alimentation, malheureusement elles causent des maladies chez la minorité de la population telles que la maladie cœliaque, les allergies ou la sensibilité au gluten non cœliaque (Anderson et Wieser, 2006 ; Ortiz *et al.* , 2017 ; Cabanillas, 2019 ; McAllister *et al.* , 2019). La maladie cœliaque (MC), ou intolérance au gluten, est une entéropathie à médiation immunitaire qui se manifeste chez les personnes prédisposées génétiquement. Elle est déclenchée par la consommation des prolamines de blé, d'avoine, d'orge et de seigle (Di Sabatino et Corazza, 2009 ; Ortiz *et al.* , 2017 ; Lebwohl *et al.* , 2018). Cette maladie se caractérise par une atrophie totale ou subtotale des villosités intestinales causant ainsi une malabsorption des nutriments (Farrell et Kelly, 2002). Elle touche toutes les tranches d'âge (Stamnaes et Sollid, 2015). A l'heure actuelle, la maladie cœliaque est l'une des maladies intestinales les plus courantes du monde (Ribeiro *et al.* , 2018). Sa prévalence est liée principalement au niveau de consommation des

protéines du gluten et aux habitudes alimentaires (Koehler *et al.*, 2014). Elle affecte environ 1,4% de la population générale (Lebwohl et Rubio-Tapia, 2020). En Algérie, elle est encore plus fréquente, atteignant approximativement 5,6% (Tonutti et Bizzaro, 2014). Le seul traitement de la maladie cœliaque est l'exclusion à vie du gluten de l'alimentation des malades cœliaques, c'est le régime sans gluten. Ce dernier est efficace pour soulager les symptômes de la maladie, normaliser les anticorps et rétablir les atrophies villositaires (Green et Cellier, 2007 ; Niland et Cash, 2018 ; Caio *et al.*, 2019). Néanmoins, ce traitement diététique a de nombreux inconvénients tels que la cherté et l'indisponibilité des aliments sans gluten et l'insatisfaction de leur qualité, le risque de contamination des aliments ou des médicaments par le gluten, et la marginalisation sociale des malades cœliaques (Zannini *et al.*, 2013 ; Ciacci *et al.*, 2015). En outre, du point de vue nutritionnel, ce régime est riche en sucres, sel, graisses totales et saturées mais pauvre en protéines et en micronutriments ce qui entraîne par conséquent des carences, notamment en fer, magnésium, acide folique, vitamine B12 et vitamine D (Ciacci *et al.*, 2015 ; Vici *et al.*, 2016 ; Melini et Melini, 2019).

Dans ce contexte, certaines études sont en cours pour l'amélioration de la qualité des aliments sans gluten sur le plan technologique, nutritionnel et organoleptique (Bourekoua *et al.*, 2016 ; Caprile *et al.*, 2016 ; Bourekoua *et al.*, 2018 ; Dib *et al.*, 2018a ; Dib *et al.*, 2018b ; Bourekoua *et al.*, 2020). D'autres études sont focalisées sur la réduction des propriétés immunogéniques et toxiques du gluten par des méthodes chimiques et/ou enzymatiques en particulier la transamination des résidus de glutamine (Gianfrani *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2015) ou la protéolyse d'épitopes immunodominants (Pyle *et al.*, 2005 ; Moreno Amador *et al.*, 2019). La réorganisation moléculaire du gluten en une nouvelle architecture supramoléculaire induite par le chitosane a également été récemment proposée (Ribeiro *et al.*, 2018).

Les traitements physiques tels que les hautes pressions, les ultrasons, le chauffage ohmique, les Micro-ondes et la Détente Instantanée Contrôlée (D.I.C) sont fréquemment appliqués en industries Agro-alimentaires visant principalement à prolonger la durée de conservation des aliments tout en préservant leurs teneurs en vitamines et leurs propriétés organoleptiques (Tonello, 1998). Ces traitements ont été proposés pour supprimer ou diminuer l'immunoréactivité et la toxicité du gluten de blé. Très peu de recherches ont étudié les effets de la DIC sur l'immunoréactivité des protéines alimentaires. Leurs résultats ont démontré que la DIC a des effets opposés sur l'immunoréactivité des protéines dépendant de la nature de la protéine et les conditions de traitement (Guillamón *et al.*, 2008 ; Cuadrado *et*

*al.* 2011 ; Takács *et al.* , 2014 ; Boughellout *et al.*, 2015). Cependant, à notre connaissance, aucune recherche n'a étudié l'effet du traitement DIC sur l'immunoréactivité du gluten de blé vis-à-vis de la maladie cœliaque et ses propriétés fonctionnelles. Il a été rapporté que la lumière pulsée et les micro-ondes diminuent considérablement l'immunoréactivité du gluten de blé (Panozzo *et al.* 2016 ; Lamacchia *et al.* , 2016). Néanmoins, l'utilisation du traitement micro-ondes pour supprimer la toxicité du gluten blé reste controversée car certaines études ont montré son inefficacité (Leszczynska *et al.* ,2003 ; Gianfrani *et al.*, 2017). De plus, le traitement de la farine de blé par les micro-ondes induit des changements des propriétés rhéologiques et fonctionnelles tout dépend de l'intensité du traitement (le niveau de la puissance et le temps de traitement appliqués). De surcroît, ce traitement rend l'isolement du gluten à partir des graines de blé et de la farine difficile et entraîne une diminution de l'aptitude à la panification (Qu *et al.* ,2017). Aucun travail scientifique n'a étudié l'effet de traitement micro-ondes sur la poudre du gluten.

La présente thèse vise à étudier la possibilité de l'application de la Détente Instantanée Contrôlée d'une part et des micro-ondes d'autre part pour réduire ou éliminer l'immunoréactivité et la toxicité de la poudre du gluten de blé et le pain à base de blé comme alternative au régime sans gluten afin d'améliorer la qualité de vie des malades cœliaques. L'étude des propriétés fonctionnelles, structurales et conformationnelles du gluten est nécessaire pour approfondir la compréhension des effets de ces traitements physiques.

# *Revue bibliographique*

## Chapitre 1. Gluten du blé et ses propriétés fonctionnelles

### 1.1. Définition

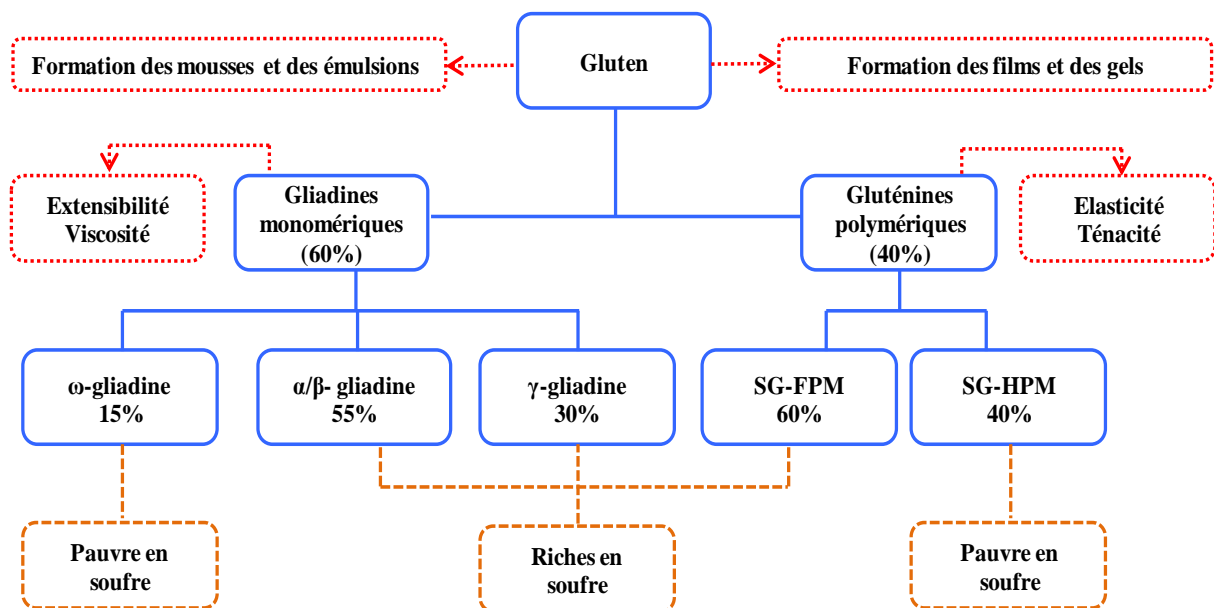
Le gluten est un complexe protéique de réserve localisé dans la couche d'aleurone et l'endosperme de la graine de blé. Il peut être défini comme une masse caoutchouteuse obtenue après élimination de l'amidon et les constituants solubles de la pâte par lixiviation (Wieser, 2007).

### 1.2. Composition chimique

Le gluten représente 80 à 85 % des protéines totales (Wieser et Koehler, 2012 ; Islam *et al.*, 2019). Il se compose de : protéines (> 80% par rapport à la matière sèche), eau (< 10%), cendres (< 2%), lipides libres (< 2%), lipides liés (~ 8%) et les fibres (< 1,5%) (Alimentarius, 1987).

### 1.3. Classification des protéines du gluten

Le gluten est composé de deux types de protéines, gliadines et gluténines, qui se différencient par leur composition en acides aminés, leurs structures et leurs fonctionnalités (Figure 1). Il est insoluble dans l'eau à cause de sa faible teneur en acides aminés avec des chaînes latérales ionisables et sa forte teneur en glutamine et les acides aminés non polaire, proline et glycine (Alais *et al.*, 2008 ; Delcour *et al.*, 2012).



**Figure 1.** Classification des protéines du gluten (Feillet, 2000 ; Islam *et al.*, 2019).

### 1.3.1. Gliadines

Les gliadines sont un mélange hétérogène des protéines monomériques de taille moléculaire variant de 18 à 75 kDa. Ces monomères peuvent être liés par des ponts disulfures. Elles représentent 60% des protéines du gluten et elles sont solubles dans les alcools. Les gliadines peuvent être classées en quatre groupes selon leurs tailles moléculaires par ordre croissant :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\omega$ . Toutes les gliadines sont composées de trois régions : N terminale, C terminale et région répétitive dont la longueur en acides aminés est différente. Les gliadines sont très riches en proline et en glutamine, d'où leur nom prolamines de blé, et pauvre en acides aminés basiques. Elles sont peu chargées en raison de leur pauvreté en acides aminés basiques et acides ce qui leur confère une forte hydrophobicité. Néanmoins, la composition en acides aminés des quatre groupes est différente. Les  $\omega$  gliadines sont dépourvues des acides aminés soufrés. Ainsi, elles sont les plus riches en glutamine et en proline et les plus pauvres en acides aminés basiques (Feillet, 2000 ; Alais *et al.* , 2008 ; Guerrieri et Cavaletto, 2018). Tandis que, les  $\alpha$  et  $\beta$  gliadines ont six cystéines qui forment trois liaisons disulfures et leur domaine non répétitif est riche en hélice  $\alpha$  et le domaine répétitif est irrégulier. Les  $\gamma$ -gliadines sont riches en coudes  $\beta$  inverse. Elles renferment huit résidus de cystéine situés dans les domaines C terminaux non répétitifs et forment des ponts disulfures conservés (Guerrieri et Cavaletto, 2018). La teneur élevée des gliadines en proline, acide aminé rigide, et en acides aminés apolaires donne une structure non globulaire. Les gliadines sont riches en hélices  $\alpha$ , structure aléatoire et coudes  $\beta$  (Cornel , 2012).

### 1.3.2. Gluténines

Les gluténines sont des protéines polymériques solubles dans les acides. Elles représentent 40% des protéines du gluten. Elles résultent de la polymérisation des sous unités gluténines de haut (SG-HPM) et de faible poids moléculaire (SG-FPM) par des liaisons covalentes (ponts disulfures) et non covalente (liaison hydrogène et interaction hydrophobe), ce qui donne naissance à des agrégats. Cinq groupes différents de sous-unités peuvent être distingués: HPM de type x et y avec un poids moléculaire compris entre 65 et 90 kDa et FPM de type B, C et D avec poids moléculaire compris entre 30 et 60 kDa. Le rapport HPM / FPM est d'environ 1/4 (Masci *et al.* ,1998). Elles sont également riches en proline et glutamine et contiennent plus des acides aminés basiques que les gliadines (Alais *et al.* , 2008 ; Feillet , 2000). La composition en acides aminés des SG-HPM et des SG-FPM est différente. Les gluténines SG-FPM sont plus pauvres en glycine (5% par rapport à 18 à 20% de HPM) et plus riches en

valine, isoleucine, leucine et phénylalanine comparativement au SG-HPM. Les gluténines contiennent les ponts disulfures intra et intermoléculaires. Les gluténines contiennent également des régions d'hélice  $\alpha$ , structure  $\beta$  et structure aléatoire (Cornel, 2012).

#### **1.4. Propriétés fonctionnelles du gluten**

Les propriétés fonctionnelles des protéines sont définies comme les propriétés physicochimiques qui affectent le comportement des protéines dans les systèmes alimentaires pendant la transformation, la préparation, le stockage et la consommation (Nakai et Modler, 1996).

Ces propriétés sont liées à la composition en acide aminés, la structures primaire, la configuration spatiale des protéines, les liaisons intermoléculaires, le rapport hydrophobicité/hydrophilie ainsi que l'interaction des protéines avec les autres composants de l'aliment (Berk, 1993 ; Nakai et Modler, 1996). Elles sont liées également aux conditions du milieu tels que : le pH, la force ionique, les traitements thermiques, l'hydrolyse et les modifications chimiques de protéines (Alais *et al.* , 2008).

Les propriétés fonctionnelles caractéristiques du gluten de blé englobent principalement la viscosité, l'élasticité, l'extensibilité, la ténacité, les propriétés moussantes, émulsifiantes, gélifiantes et celles de formation des films.

##### **1.4.1. Viscoélasticité et extensibilité**

Les protéines du gluten sont classées selon la teneur en cystéine en sous unités pauvres en soufre ( $\omega$ -gliadine et SG-HPM) et riches en soufre ( $\alpha / \beta$ -,  $\gamma$ -gliadines et SG-FPM). Les  $\alpha / \beta$ -,  $\gamma$ -gliadines et SG-FPM contiennent deux ou quatre fois plus de résidus de cystéine que SG-HPM ; la  $\omega$ -gliadine ne contient aucun résidu de cystéine ou de méthionine (Shewry, Tatham, 1997). L'élasticité et l'extensibilité sont les principales propriétés fonctionnelles du gluten . Elles sont dues essentiellement aux ponts disulfures formés entre les résidus de cystéine. Pour cela, la teneur en ces derniers est un facteur déterminant de ces propriétés. L'élasticité est due aux liaisons disulfures intra- et intermoléculaires dans les polymères de gluténines alors que l'extensibilité est liée à la présence de liaisons disulfures intramoléculaires dans les gliadines. Les propriétés de viscosité et de ténacité sont attribuées respectivement aux gliadines et gluténines. En effet, les  $\gamma$ -gliadines et les SG-HPM sont les composantes les plus fonctionnelles (Feillet, 2000). Les proportions des sous unités pauvres et riches en soufre ainsi que leur composition dépendent de la disponibilité de soufre dans le sol, ce qui influence la

qualité du grain. La faible disponibilité de sol en soufre entraîne une augmentation de la quantité de sous-unités pauvres en soufre, y compris la  $\omega$ -gliadine et les SG-HPM, et une légère réduction de la quantité de gliadines et des SG-FPM. Par conséquent, une augmentation de l'élasticité et diminution de l'extensibilité. En fin de compte, l'effet d'une teneur élevée en soufre diminuera l'élasticité et augmentera simultanément l'extensibilité (Islam *et al.* , 2019).

#### **1.4.2. Propriétés moussantes**

La propriété moussante est due à la réduction des tensions superficielles interfaciale par les protéines à caractère amphiphile qui s'orientent favorablement aux interfaces eau/air (Alais *et al.* ,2008).

Les propriétés moussantes des protéines de blé jouent un rôle important dans la panification et la fabrication des produits à base de blé. Le pain se développe sous la forme d'une structure semblable à la mousse en raison du piégeage d'un nombre énorme de bulles de gaz. La capacité moussante dépend de la teneur en protéines et de la quantité du sel contenue dans la pâte. Ainsi, la stabilité moussante dépend essentiellement du pH du milieu. Des mousses denses et stables du gluten ont été formées à pH 7,5, c'est-à-dire dans la zone du pH isoélectrique du gluten. La haute stabilité des mousses du gluten est due au niveau élevé de liaison hydrogène entre le grand nombre de résidus de glutamine. Il a été montré que la capacité et la stabilité moussantes des gluténines sont plus élevées que celles des gliadines ou du gluten lui-même en raison de la taille moléculaire élevée et des polymères formés par les liaisons disulfures (Zayas, 1997).

#### **1.4.3. Propriétés émulsifiantes**

L'émulsion est une dispersion de deux ou plusieurs liquides non miscibles en présence d'un agent émulsifiant à caractère amphiphile qui a le rôle de réduire la tension superficielle en formant un film viscoélastique autour des gouttelettes pour stabiliser l'émulsion (Lam et Nickerson , 2013).

Les protéines du gluten ont un faible pouvoir émulsifiant à cause de leur faible solubilité dans les solutions aqueuses en raison de leur forte teneur en acides aminés apolaires (proline et leucine) et en acide aminé polaire mais non ionisable (glutamine) (Takeda *et al.* ,2001 ; Popineau *et al.* ,2002). En général, les protéines du gluten subissent des modifications chimiques et/ou enzymatiques pour diminuer leur masses moléculaires et démasquer les



groupes hydrophobes pour augmenter l'hydrophobicité de surface et par conséquent augmenter les propriétés émulsifiantes (Lam et Nickerson , 2013). Des nombreux chercheurs ont réussi à améliorer les propriétés émulsifiantes du gluten par des méthodes chimiques telles que l'acylation, hydrolyse acide, déamidation (Zukowska *et al.* ,2008) ou par des méthodes enzymatiques comme l'hydrolyse limitée suivie par un traitement par transglutaminase (Agyarea *et al.* , 2009). En outre, la combinaison des méthodes chimiques et enzymatiques ont donné des bons résultats pour l'amélioration des propriétés émulsifiantes comme la digestion enzymatique acide suivie par la conjugaison de dextrane, l'hydrolyse enzymatique et la digestion acide suivie par un traitement par transglutaminase microbienne (Kato *et al.*, 1991 ; Babiker *et al.* ,1996).

#### **1.4.4. Propriétés de formation des gels**

Les protéines du gluten peuvent former des gels sous l'effet de la chaleur grâce à des interactions covalentes (ponts disulfures) et non covalentes (liaisons ioniques, hydrogènes et hydrophobes). La formation de gels est complexe. Elle implique deux principaux processus : le dépliage thermique et l'agrégation des protéines. Pendant le chauffage, les protéines du gluten de blé se déplient et les régions hydrophobes et les groupements thiols libres s'exposent. Lorsque la température de gélification est supérieure à 60 °C, les réactions de réticulation entre les molécules du gluten de blé se produisent. Les protéines se déplient et s'agrègent via la formation des ponts disulfures et liaisons hydrogènes et par la suite les agrégats agglomérés forment un réseau tridimensionnel (Wang *et al.* ,2017).

#### **1.4.5. Propriétés de formation des films**

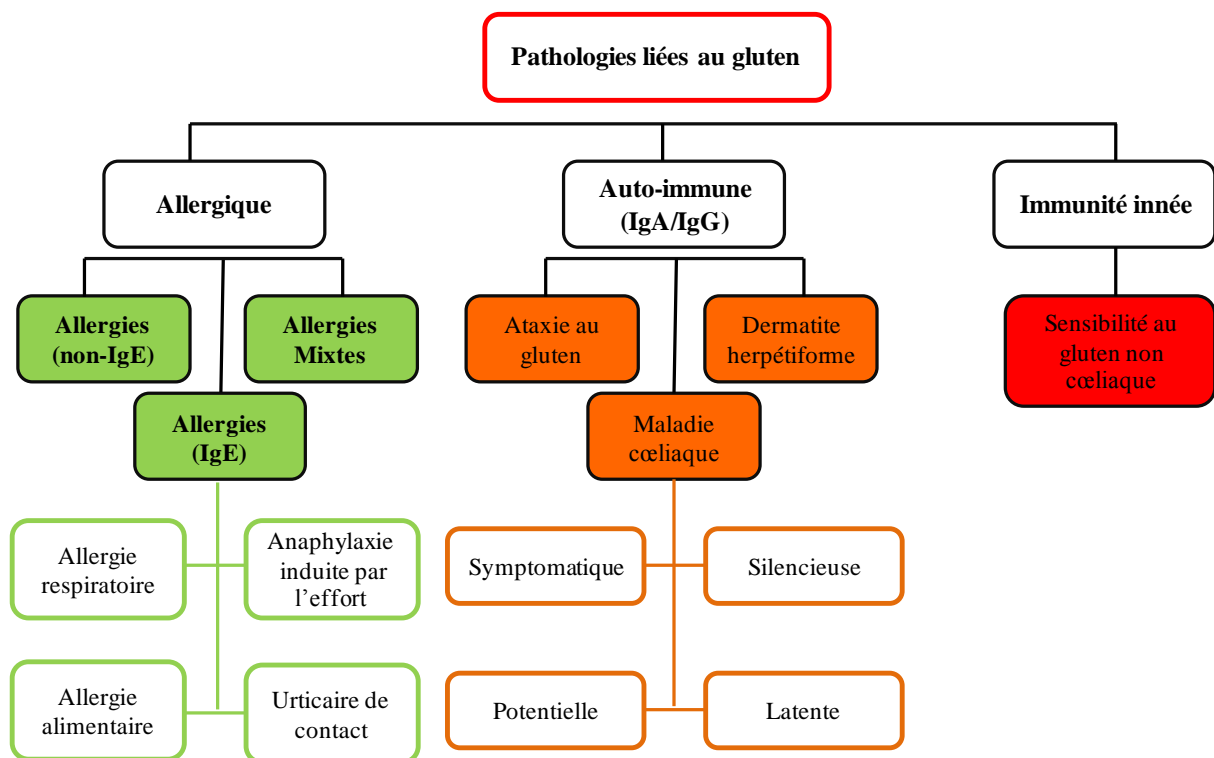
Les protéines du gluten de blé peuvent se transformer en films à hautes températures en présence de produits chimiques par deux procédés technologiques, par voie humide et sèche. Les deux procédés qui permettent la formation d'un réseau macromoléculaire ont le même principe. Ils consistent à perturber les liaisons intermoléculaires, qui stabilisent les polymères à l'état natif, par un agent perturbateur pour réarranger et réorienter les chaînes polymériques conduisant à la formation d'un réseau tridimensionnel stabilisé par de nouvelles interactions et liaisons après avoir éliminé l'agent perturbateur. Le premier procédé dit procédé de coulage continu (par voie humide) est basée sur la dispersion des protéines dans un solvant (généralement l'eau ou l'alcool) en présence d'un agent perturbateur pour former une solution filmogène. Cette dernière est étalée en couche mince dans des moules et le solvant est éliminé. Le deuxième procédé dit par voie sèche requiert une plastification et un traitement

thermique du matériau au-dessus de la température de transition vitreuse avec la mise en forme par extrusion ou thermoformage (Angellier-Coussy *et al.*, 2011 ; Djuikom Noutsu, 2012).

## Chapitre 2. Pathologies liées au gluten

Les pathologies liées au gluten représentent un groupe complexe des maladies qui impliquent l'activation du système immunitaire provoquée par l'ingestion du gluten. Elles se distinguent par leur mécanisme pathologique (Figure 2). Parmi ces pathologies : la maladie cœliaque (MC), qui est la maladie la plus étudiée avec une prévalence de 1,4% (Lebwohl et Rubio-Tapia, 2020), la sensibilité au gluten non cœliaque (SGNC), avec une prévalence plus élevée 7%. Il existe autres maladies causées par le gluten moins fréquentes telles que l'allergie au blé, avec une prévalence globale de moins de 0,1%, l'ataxie au gluten et la dermatite herpétiforme (Lammers *et al.*, 2018). L'ataxie au gluten et la dermatite herpétiforme sont des formes d'intolérance rares. La dermatite herpétiforme, maladie associée à la MC, se présente comme une éruption cutanée et des dépôts granuleux d'IgA dans la peau et affecte 1 à 6 personnes par 10.000 (Salmi *et al.*, 2011). Pour l'ataxie au gluten, les anticorps produits contre les prolamines causent des dommages au cervelet (la partie du cerveau responsable de l'équilibre et du contrôle moteur) (Hadjivassilou *et al.*, 2008).

Nous allons détailler dans cette partie tout ce qui concerne les principales maladies liées au gluten, maladie cœliaque, sensibilité au gluten et allergie au blé, en raison de ressemblances des symptômes ce qui rend leur diagnostic difficile.

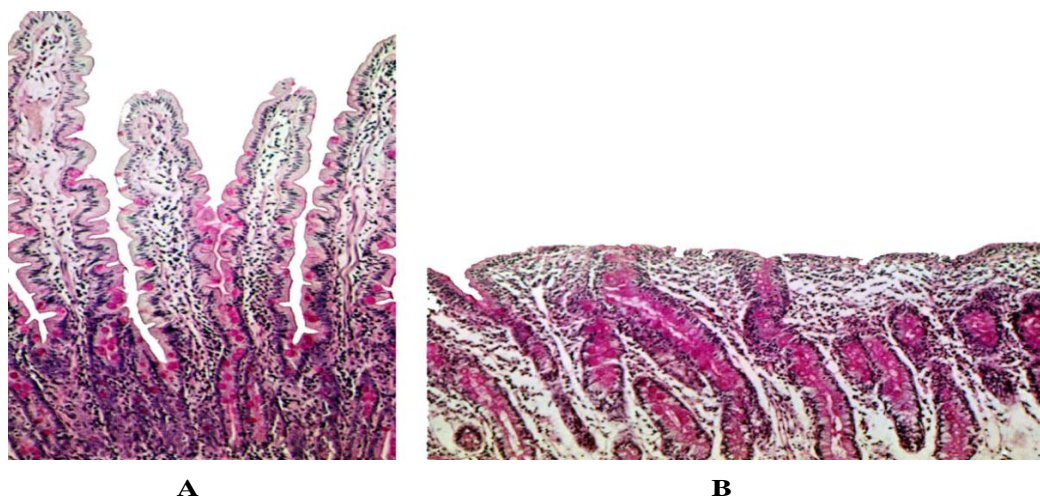


**Figure 2.** Pathologies liées au gluten (Lammers *et al.*, 2018 ; Scherf, 2019).

## 2.1. Maladie cœliaque

### 2.1.1. Définition

La maladie cœliaque, appelée aussi intolérance au gluten, est une entéropathie chronique d'origine autoimmune qui se manifeste chez les personnes prédisposées génétiquement suite à l'ingestion du gluten (Jericho et Guandalini, 2018). Elle est caractérisée par des lésions intestinales, prédominantes au niveau de l'intestin grêle proximal, qui se traduisent par une atrophie villositaire duodénojunale (Figure 3), augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux, hyperplasie des cryptes, la diminution du rapport villosités/cryptes et un infiltrat lymphocytaire du chorion (Verkarre et Brousse, 2013).



**Figure 3.** Coupe transversale de la muqueuse intestinale (Koehler *et al.*, 2014).

A/Muqueuse intestinale normale. B/ Muqueuse intestinale atrophique d'un malade cœliaque.

### 2.1.2. Facteurs de risque de la maladie cœliaque

La maladie cœliaque est une maladie multifactorielle contrôlée par la combinaison des facteurs génétiques et environnementaux. En effet, la prédisposition génétique et le gluten sont des facteurs majeurs mais ils ne sont pas suffisants pour le déclenchement de cette maladie (Koehler *et al.*, 2014).

#### 2.1.2.1. Facteurs génétiques

Les principaux facteurs génétiques sont représentés par les gènes HLA-DQ2 ou DQ8 localisés sur le locus chromosomique 6 p21. Ces gènes expliquent environ 40% de la prédisposition génétique de la maladie cœliaque. Tandis que les 60% restants sont expliqués par des gènes non –HLA comme les gènes associés à la production de protéines intervenant

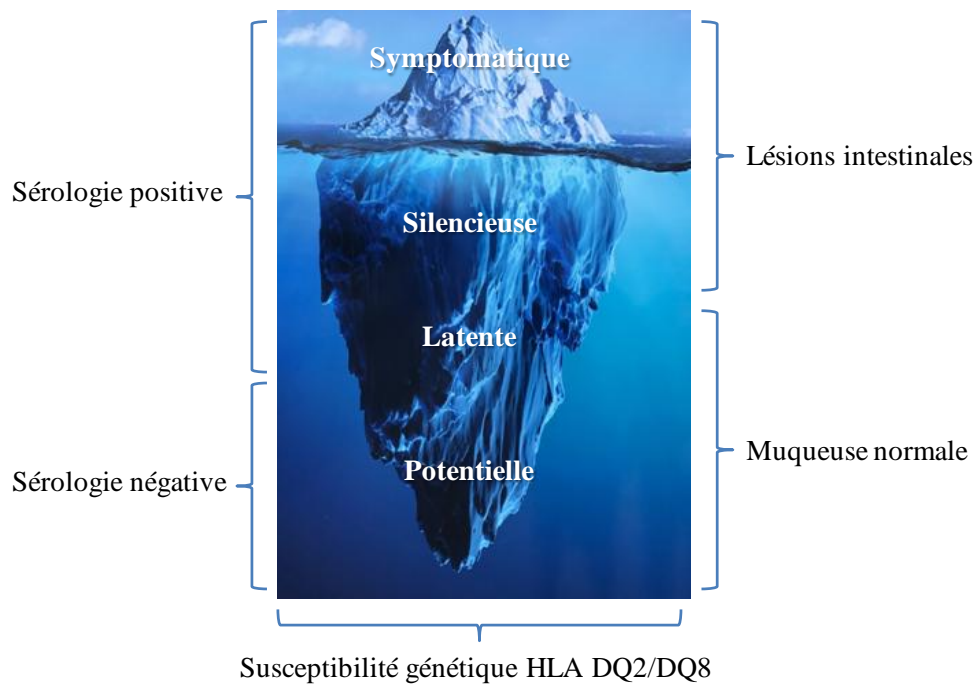
dans la réponse immunitaire adaptative, les gènes associés ou non au développement du diabète de type 1 et ceux du contrôle de la perméabilité intestinales (Nion-Larmurier et Cosnes, 2009 ; Gutierrez-Achury *et al.* ,2011 ; Koehler *et al.* ,2014). La quasi-totalité des malades cœliaques sont positifs pour DQ2 (90 à 95%) et les autres sont positifs pour DQ8 (5 à 10 %). Les protéines HLA-DQ sont des hétérodimères composées de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Elles sont exprimées à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques matures, macrophages, cellules B) et elles sont responsables de la liaison spécifique aux peptides toxiques du gluten. Deux iso-formes courantes du DQ2 ont été découvertes DQ2.5 et DQ2.2. Le génotype HLA-DQ2.5 est associé à un risque très élevé de la MC, suivi par DQ8 (élevé) et DQ2.2 (faible). Cette sensibilité à la maladie est liée par les différents effets de dosage des hétérodimères et la capacité des deux molécules HLA à former des complexes stables avec de nombreux peptides du gluten (Vader *et al.* ,2003 ; Fallang *et al.* , 2009).

#### **2.1.2.2. Facteurs environnementaux**

Le principal facteur environnemental associé à la MC est le gluten. En outre, la durée de l'allaitement maternel, l'âge de l'introduction du gluten et sa quantité introduite pendant le sevrage chez l'enfant et l'arrêt du tabac chez l'adulte jouent un rôle important dans l'apparition de la maladie. Les autres facteurs environnementaux qui peuvent déclencher la maladie sont ceux qui altèrent la barrière intestinale en augmentant la perméabilité aux peptides du gluten ainsi que l'expression d'HLA DQ et la concentration de transglutaminase tissulaire et par conséquent le déclenchement du processus immunitaire (Olives, 2013). Les infections par certains agents pathogènes notamment les adénovirus 12, le virus de l'hépatite C et les rotavirus, les virus à ARN double brins induisent la production de l'interféron  $\gamma$  et de l'interleukine 15 (IL-15), qui sont les éléments clés de la MC, sont également des facteurs de risque de cette maladie (Nion-Larmurier et Cosnes, 2009 ; Koehler *et al.* ,2014).

#### **2.1.3. Symptômes**

Les symptômes de la MC sont très variés et ils dépendent de l'âge de malade. Il existe cinq formes de la MC : formes symptomatique, atypique, silencieuse, latente et potentielle. Ces formes sont classées selon les symptômes, la positivité de la sérologie et les lésions intestinales (Figure 4).



**Figure 4.** Iceberg de la maladie cœliaque (Meazza et Bozzola, 2014).

La forme symptomatique, classique, est fréquente chez l'enfant et se manifeste après quelques semaines de l'introduction du gluten dans son alimentation. C'est la forme la mieux connue et la plus rapidement diagnostiquée (Mouterde *et al.*, 2011). Elle se caractérise par la présence de symptômes intestinaux ou extra-intestinaux, d'une atrophie villositaire avec hyperplasie des cryptes et d'auto-anticorps circulants. Le principal symptôme est une diarrhée chronique qui existe chez plus de 90 % des cas. Une malabsorption intestinale est responsable des selles grasses, pâles et fétides et des carences en micronutriments (fer, folates, calcium, vitamine D, ..). Une anorexie, une fonte musculaire, ballonnements, vomissements et arrêt de croissance sont aussi observés.

Les formes atypique, silencieuse, latente et potentielle sont fréquentes chez l'adulte (Rampertab *et al.*, 2006).

Les formes atypiques se manifestent tardivement avec des symptômes digestifs modérés ou des signes extra-intestinaux comme le retard de croissance, les douleurs abdominales et osseuses, l'anémie ferriprive, la constipation, les troubles neurologiques, l'hypoplasie de l'email dentaire, l'aphtose buccale récidivante, le rachitisme, l'ostéoporose, les selles irrégulières, le retard pubertaire, dermatite herpétiforme, l'élévation des transaminases et le syndrome hémorragique (Lamireau et Clouzeau, 2013).

Dans la forme silencieuse, il n'a y aucun signe clinique qui apparait, la sérologie est positive et une atrophie villositaire de sévérité variable est observée. De même, la forme latente de la MC ne présente aucun symptôme avec une positivité des marqueurs sérologiques, anticorps anti-endomysium et anti-transglutaminases, et génétiques, génotypes HLA prédisposant DQ2/DQ8, et une muqueuse intestinale normale ou présentant des anomalies minimales (Rampertab *et al.* ,2006).

Dans la forme potentielle, les marqueurs sérologiques sont absents, les marqueurs génétiques sont positifs et l'histologie de la muqueuse intestinale est normale. Cependant, les malades ayant cette forme peuvent développer au cours du temps des lésions intestinales en cas de l'ingestion du gluten (Rampertab *et al.* ,2006).

#### 2.1.4. Épitopes impliqués dans la maladie cœliaque

Les épitopes impliqués dans la maladie cœliaque sont situés dans les domaines répétitifs des prolamines, riches en proline et glutamine, et à cause de leurs teneurs élevés en proline l'activité protéolytique au niveau du tractus gastro-intestinal est réduite (Shewry et Tatham, 2016). Ces épitopes sont répartis en deux types, toxiques et immunogènes. Les épitopes toxiques sont ceux qui sont capables d'induire des lésions intestinales soit lorsqu'ils sont ajoutés à la muqueuse duodénale en culture ou lorsqu'ils sont administrés *in vivo* dans l'intestin grêle proximal et distal (Tableau 1).

**Tableau 1.** Épitopes toxiques (Ciccocioppo *et al.* ,2005).

Séquence en acides aminés	Position	Toxicité
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	$\alpha$ -gliadine: 3–21	-
PGQQQPFPPQQPY	$\alpha$ -gliadine: 31–43	+
PGQQQPFPPQQPYQPQP	$\alpha$ -gliadine: 31-49	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPFPSSQQPY	$\alpha$ -gliadine: 31-55	+
PQPQPFPSQQPY	$\alpha$ -gliadine: 44-55	+
SQQPYLQLQFPQPQLPY	$\alpha$ -gliadine: 51-70	+
LQLQFPQPQLPYQPQLPY	$\alpha$ -gliadine: 56-75	+
QQYPLGQGSFRPSQQNPQA	$\alpha$ -gliadine: 202-220	-
LGQGSFRPSQQN	$\alpha$ -gliadine: 206-217	+

+ : forte toxicité, - : faible toxicité.

Alors que les épitopes immunogènes sont capables de stimuler les lignées cellulaires T HLA-DQ2 ou DQ8 et les clones de cellules T dérivés de la muqueuse jéjunale ou du sang périphérique des malades cœliaques (Tableau 2). Les épitopes immunogènes sont subdivisés eux mêmes en épitopes immunodominants et simplement immunogènes. Les épitopes immunodominants sont ceux qui ont la capacité de provoquer une forte réponse des lymphocytes T de biopsies intestinales de presque tous les patients. Alors que, les épitopes simplement immunogènes stimulent les lymphocytes T de certains patients seulement (Ciccocioppo *et al.* ,2005). En outre, certains peptides identifiés comme inactifs ou simplement immunogènes dans leur forme native deviennent des stimulants très puissants des lymphocytes T après traitement par tTG (Ciccocioppo *et al.* ,2005).

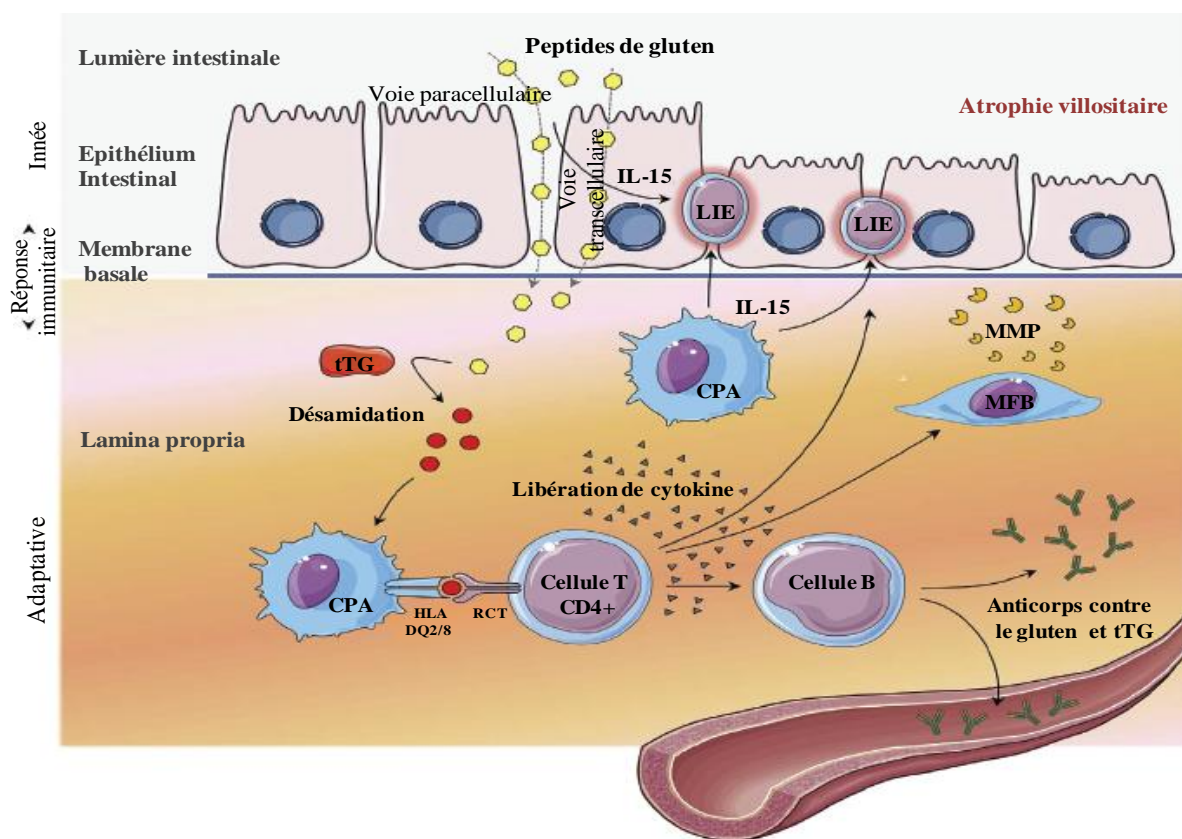


**Tableau 2.** Épitopes immunogènes (Ciccocioppo *et al.*, 2005).

Séquences en acides aminés	Position	Immunogénéicité	
VRVPVPLQPNPSQQQPQ	$\alpha$ -gliadine: 1–19	+	(a) : Forme déamidée.
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	$\alpha$ -gliadine: 11–28	+	
QVPLVQQQFPGQQQPFPPQ	$\alpha$ -gliadine: 21–40	+	+ : épitope simplement immunogène.
PGQQQPFPPQQYPQPQPF	$\alpha$ -gliadine: 31–49	+	
FPGQQQPFPPQQYPQPQPF	$\alpha$ -gliadine: 30–49	+	+++ : épitope immunodominant.
QPYPQPQPFPSQQPYLQL	$\alpha$ -gliadine: 41–58	+	
PQPFPSQQPYLQLQPFQ	$\alpha$ -gliadine: 46–63	+	
PQPQLPYPQPQLPY	$\alpha$ -gliadine: 62–75/(a)	+ /+++	
QLQPFQQLPY	$\alpha$ -gliadine: 57–68 (a)	+ /+++	
QLQPFQ	$\alpha$ -gliadine 57–63 (a)	+++	
LQLQPFQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (33-mer)	$\alpha$ -gliadine: 57–89/(a)	+ /+++	
QLQPFQQLPY	$\alpha$ -gliadine: 58–69/(a)	+ /+++	
PQPQLPYPQPQLPY	$\alpha$ -gliadine: 63–76/(a)	+ /+++	
PFRPQQYPQPQPQ	$\alpha$ -gliadine: 93–106 (a)	+	
LIFCMDVVLQ	$\alpha$ -gliadine: 123–132	+	
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQG	$\alpha$ -gliadine: 198–222	+	
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	$\alpha$ -gliadine: 203–220/(a)	+ /+	
PSGQGSFQPS	$\alpha$ -gliadine: 205–214	-	
PSGQGSFQPSQQ	$\alpha$ -gliadine: 205–216/(a)	+ /+++	
SGQGSFQPSQQN	$\alpha$ -gliadine: 206–217/(a)	+ /+++	
QGSFQPSQQN	$\alpha$ -gliadine: 208–217/(a)	- /+++	
LQPQQPFQPPQYPQPQPQ	$\gamma$ -gliadine: 60–79	+	
FPQQPQQYPQPQPQ	$\gamma$ -gliadine: 66–78	+	
FSQPQQQFQPQ	$\gamma$ -gliadine: 102–113/(a)	- /+	
OQPQQSFPEQQ	$\gamma$ -gliadine: 134–153/(a)	+ /+++	
VQGQGIQPQQPAQL	$\gamma$ -gliadine: 222–236/(a)	+ /+	
QQQQPPFSQQQSPFSQQQQ	gluténine: 40–59/(a)	- /+	
QQPPFSQQQQLPQ	gluténine: 46–60/(a)	- /+	
SGQGQRPGWLQPGQGQQGYYPTSPQQSGQGQQLGQ	gluténine: 707–742/(a)	+ /+	
PGQGQQGYYPTSPQQSGQ	gluténine: 719–736	+	
GYYPTSPQQSGQGQQLGQ	gluténine: 725–742	+	
GYYPTSPQQSG	gluténine: 725–735	+	
QGYYPTSPQQS	gluténine: 724–734/(a)	+ /-	
QQGYYPTSPQQSG	gluténine: 723–735	+	
GQQGYYPTSPQQSG	gluténine: 722–735	+	
GQQGYYPTSPQQS	gluténine: 722–734	+	

### 2.1.5. Physiopathologie

La physiopathologie de la MC implique à la fois le système immunitaire inné et adaptatif (Figure 5). Les prolamines de céréales impliquées dans la MC sont la gliadine de blé, l'hordeine de l'orge et la sécaline de seigle. Ces protéines ne sont toxiques que chez les personnes prédisposées génétiquement. Elles sont résistantes à la dégradation acide et enzymatique à cause de leur richesse en proline et en glutamine d'une part et l'absence des enzymes à activité prolylendopetidase dans le tube digestif d'autre part. Les peptides issus de la digestion incomplète du gluten traverse la paroi intestinale par voie cellulaire ou transcellulaire (Schumman *et al.*, 2008).



**Figure 5.** Physiopathologie de la maladie cœliaque (Ribeiro *et al.*, 2018).

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène, IL-15 : Interleukine-15, LIE : Lymphocytes intraépithéliaux, MFB : myofibroblaste, MMP : Métalloprotéinase, RCT : Récepteur des cellules T, tTG : Transglutaminase tissulaire.

#### ➤ Réponse immunitaire adaptative

Les réactions adaptatives s'effectuent au niveau du chorion. Les peptides issus de la digestion du gluten sont déamidés par la transglutaminase tissulaire (tTG2) et prennent une charge négative (Figure 5) qui a une grande affinité pour HLA-DQ2 et -DQ8 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Ce qui provoque l'activation des cellules T auxiliaires CD4+ qui produisent les cytokines pro-inflammatoire particulièrement l'interféron

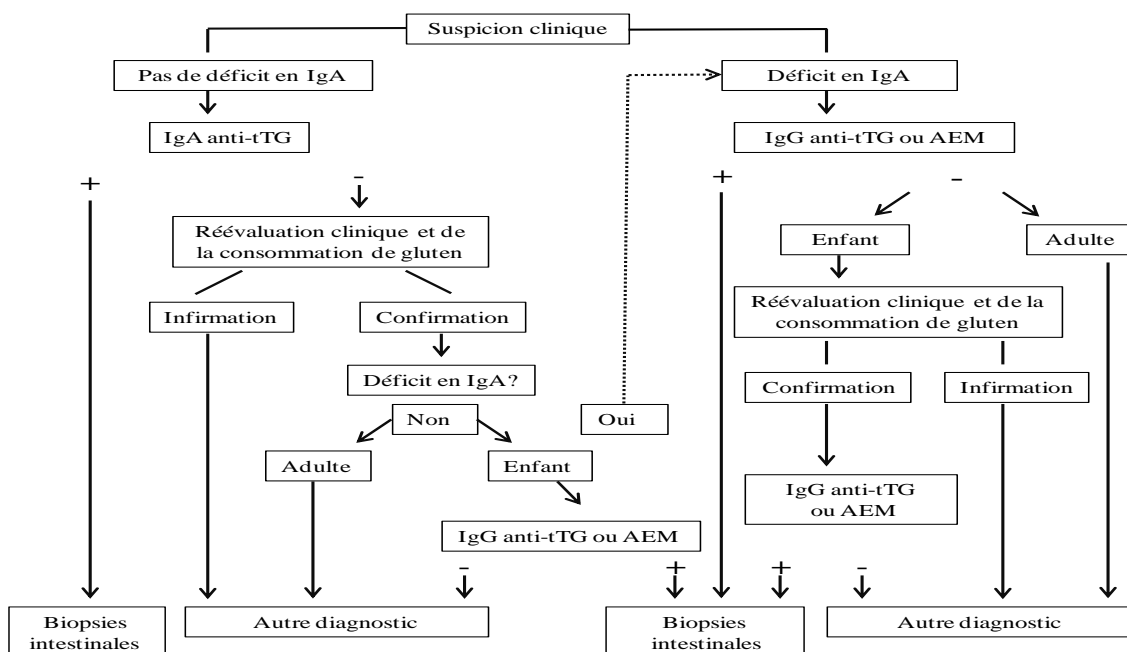
$\gamma$  et l'interleukine 21 (IL-21). Ces derniers induisent la prolifération des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE) qui régulent les réponses immunitaires adaptatives et innées. Les cellules B sont aussi activées par ce complexe et elles se différencient en plasmocytes qui produisent les anticorps anti-gliadine, anti-endomysium et anti-transglutaminase. Les médiateurs produits pendant l'inflammation endommageant les tissus ainsi que les métallo-protéinases libérées par les myofibroblastes activés aboutissent à l'atrophie villositaire (Schumman *et al.*, 2008 ; Ribeiro *et al.*, 2018).

➤ **Réponse immunitaire innée**

Cette réponse s'effectue au niveau de l'épithélium intestinal. Elle est activée par les peptides du gluten qui provoquent la surexpression de l'IL-15 par les entérocytes, entraînant l'activation des LIE et une régulation positive de l'expression des récepteurs des cellules T naturelles tueuses (NK) (NKG2D et CD 9/NKG2A). Cette cascade de réactions engendre la destruction des cellules épithéliales. Les cellules dendritiques sont également une source d'IL-15 en reliant les deux systèmes de l'immunité (Schumman *et al.*, 2008 ; Ribeiro *et al.*, 2018).

**2.1.6. Diagnostic**

Le diagnostic de la MC repose sur quatre critères : sérologie, histologie, efficacité du régime sans gluten et typage HLA de classe II (Figure 6).



**Figure 6.** Stratégie diagnostique de la maladie cœliaque (Malamut et Cellier, 2010).

tTG : transglutaminase tissulaire; AEM : anti-endomysium; + : présence ; - : absence.

### **2.1.6.1. Diagnostic sérologique**

Les premiers anticorps (Ac) à rechercher sont les IgA anti-tTG en raison de leur haute sensibilité et spécificité (plus de 95%). Ainsi, les anticorps anti-endomysium les plus spécifiques (98 à 100%) sont mesurés pour confirmation de la MC (Sapone *et al.*, 2012). Alors que les anticorps anti-gliadine ne sont pas mesurés dans la plupart des cas à cause de leur faible spécificité. En cas de la négativité des anticorps IgA anti-tTG et anti-EMA, un dosage pondéral des anticorps est indispensable pour rechercher le déficit en IgA observé chez la minorité des MC (2 à 3%) et un dosage des Ac IgG anti-tTG est recommandé (McGowan *et al.*, 2008).

### **2.1.6.2. Diagnostic histologique**

La positivité des anticorps spécifiques de la MC, anticorps anti-transglutaminases et anti-endomysium, est suivie par la biopsie intestinale avant de prescrire le régime sans gluten (Malamut et Cellier, 2010). Chez l'adulte, la fibroscopie œsogastroduodénale avec biopsies duodénales doivent être effectuées pour confirmer la maladie. Alors que chez l'enfant, les signes évocateurs de la MC, les taux en Ac anti-tTG élevés (supérieur à dix fois la limite supérieure de la normale), les Ac anti-EMA et typage HLA sont suffisants pour la confirmation de la maladie sans la nécessité de faire une biopsie duodénale (Bouteloup, 2016).

### **2.1.6.3. Régime sans gluten**

La positivité des tests sérologiques et histologiques conduisent à la prescription du régime sans gluten. L'amélioration clinique sous régime sans gluten permet de confirmer le diagnostic (Malamut et Cellier, 2010).

### **2.1.6.4. Typage HLA de classe II**

La réalisation du typage HLA de classe II permet de conforter le diagnostic en cas de positivité DQ2 et/ou DQ8 (Malamut et Cellier, 2010).

## **2.2. Sensibilité au gluten non cœliaque SGNC**

### **2.2.1. Définition**

C'est une maladie au cours de laquelle des symptômes digestifs et extradiigestifs apparaissent suite à l'ingestion du gluten et disparaissent après le suivi du régime sans gluten. Aucun mécanisme autoimmunitaire et allergique n'intervient dans cette maladie (Bouteloup, 2016)

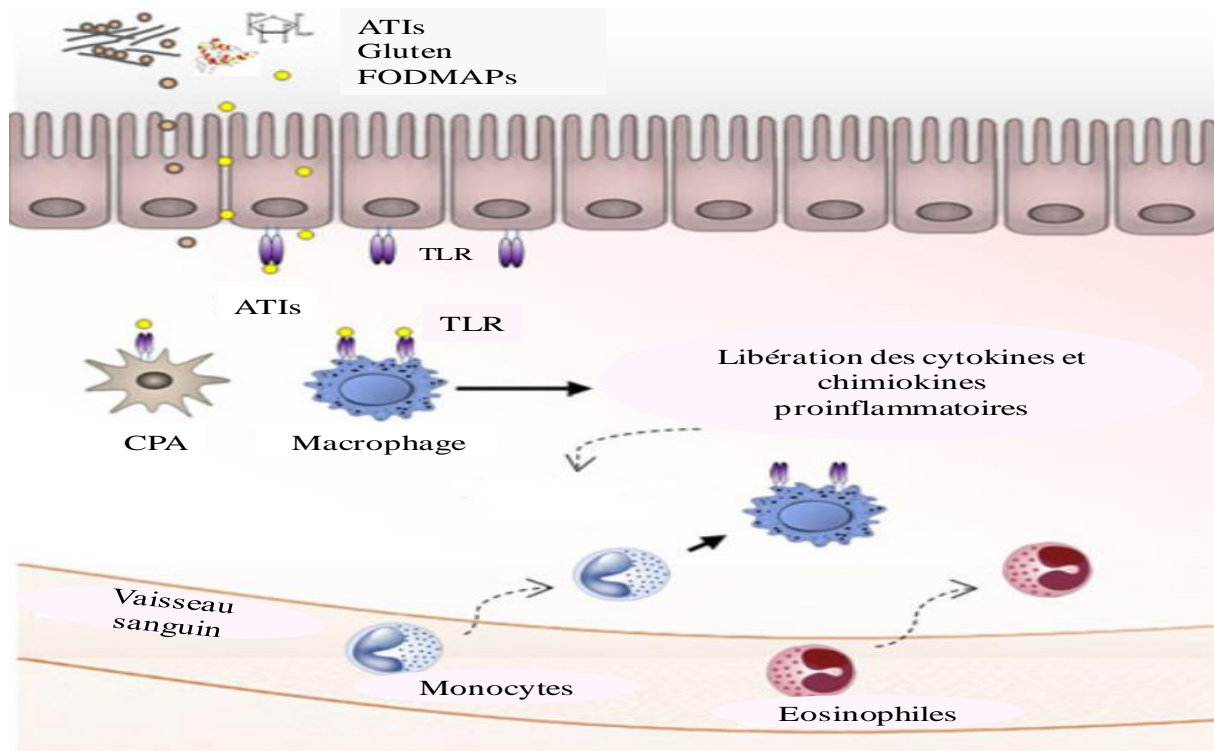
### 2.2.2. Symptômes

Les symptômes de la SGNC peuvent être digestifs et/ ou extradigestifs et ils diffèrent selon l'âge du malade. Chez l'adulte, les symptômes digestifs sont principalement douleurs abdominales, diarrhée, ballonnement. L'eczéma et/ou éruption cutanée, maux de têtes, fatigue chronique, dépression, anémie, sensation d'esprit embrumé, engourdissement au niveau des jambes, bras et/ou doigts et douleurs articulaires et musculaires sont les symptômes extradigestifs les plus observés (Sapone *et al.*, 2012). Chez l'enfant, les principaux signes digestifs sont les douleurs abdominales et diarrhée sans perte de poids. Tandis que les signes extradigestifs restent rares comme fatigue et troubles de l'attention (Francavilla *et al.*, 2014).

### 2.2.3. Physiopathologie

Le mécanisme de la SGNC n'est pas bien connu. Il est suggéré que le système inné pourrait avoir un rôle prédominant. Néanmoins, le système adaptatif est également impliqué. Une expression élevée des récepteurs de type toll (TLR) 1 et 2 au niveau des intestins des malades sensibles au gluten non cœliaques est observée par rapport aux sujets sains. Comparativement aux malades cœliaques, ces malades sensibles ont une faible augmentation des LIE et ils sont dépourvus des anticorps IgA anti-tTG. De plus, ces malades ont une faible expression des cytokines impliqués dans la réponse immunitaire adaptative au niveau de l'intestin par rapport aux malades cœliaques. Du point de vue génétique, la sensibilité au gluten non cœliaque est légèrement plus associée aux HLA-DQ2 et /ou DQ8 que la population générale (Sapone *et al.*, 2011).

Cependant, le gluten n'est pas le seul déclencheur de la sensibilité au gluten non cœliaque, les inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase et de trypsine (ATIs) et les oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides et polyols fermentescibles par la flore intestinale (FODMAPs) les sont aussi (Figure 7).



**Figure 7.** Physiopathologie de la sensibilité au gluten non cœliaque (Cabanillas, 2019).

ATIs : Inhibiteurs d'alpha-amylase et de trypsine, CPA : cellule présentatrice de l'antigène, FODMAPs: oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides et polyols fermentescibles par la flore intestinale, TLR: Récepteur de type Toll.

Il est suggéré que les ATIs activent les cellules dendritiques ou les macrophages via TLR4 induisant la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Une infiltration accrue d'éosinophiles dans la muqueuse intestinale est observée. Le peptide de la gliadine 33-mer active le système immunitaire inné via TLR 4 et TLR 2 induisant ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoire qui peuvent être la clé dans les troubles liés au gluten (Figure 7). Cependant, les dommages potentiels de l'activation du système immunitaire inné dans la SGNC sont faibles et se traduisent par des symptômes bénins par rapport à la maladie cœliaque et l'allergie IgE médiée (Leonard *et al.* , 2017).

#### 2.2.4. Diagnostic

En raison de l'absence des lésions intestinales et des anticorps spécifiques de la MC, Ac anti-tTG et anti-EMA, le diagnostic de la sensibilité au gluten est basé essentiellement sur l'exclusion du gluten de l'alimentation des malades.

## 2.3. Allergie au blé

### 2.3.1. Définition

L'allergie ou hypersensibilité est une réaction exagérée ou inappropriée du système immunitaire vis-à-vis un antigène dit allergène. Les allergies au blé sont définies comme des réponses immunitaires indésirables dirigées contre les protéines de blé. Ces réactions se produisent chez les personnes prédisposées génétiquement et peuvent être IgE médiée (allergie immédiate) ou non IgE médiée (allergie retardée, cellulaire type hypersensibilité) ou bien mixtes (Scherf, 2019).

### 2.3.2. Symptômes

Les signes cliniques de l'allergie au blé sont similaires aux autres allergies alimentaires avec des symptômes immédiats ou retardés. Il existe quatre types d'allergie au blé qui sont classés en fonction du mécanisme immunologique impliqué et le mode de pénétration de l'allergène (Sapone *et al.*, 2012 ; Tovoli *et al.*, 2015) :

- ✓ Allergie alimentaire qui est due à l'ingestion des produits à base de blé. Les symptômes sont variés : digestifs, respiratoires et/ou cutanés. Les principaux symptômes typiques sont démangeaisons, rash cutanée et angio-œdème (cutanés), rhinoconjonctivite et bronchospasme (respiratoire), gonflement au niveau de la bouche, douleurs abdominales avec nausée, ballonnement et diarrhée (digestifs) et choc anaphylactique.
- ✓ Anaphylaxie au blé induite par l'effort survient lorsque l'ingestion de blé s'accompagne d'une activité physique. Elle est fréquente chez l'adulte et rare chez l'enfant. Les symptômes sont divers : urticaire généralisé, asthme, ballonnement, diarrhée et parfois choc anaphylactique.
- ✓ Asthme de boulanger est parmi les allergies professionnelles les plus courantes qui se manifestent par des symptômes respiratoires suite à l'inhalation de blé.
- ✓ Urticaire du contact, avec des symptômes cutanés, est induite par le contact avec la farine de blé.

### 2.3.3. Allergènes de blé

Les allergènes incriminés englobent les protéines de la fraction salino-soluble (albumines et globulines) ainsi que celles de la fraction insoluble (gliadines et gluténines) (Tableau 3). Des protéines de la famille des inhibiteurs d' $\alpha$  amylases/ inhibiteurs trypsiques (ATIs) de poids moléculaire variant entre 12 et 18 kDa et les  $\alpha$ - et  $\omega$ 5-gliadines sont des allergènes impliqués dans l'asthme de boulanger. Pour l'allergie alimentaire au blé, les  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\omega$ -

gliadines ainsi que les gluténines ont été identifiés comme allergènes dont leur fixation par les IgE spécifiques dépend de l'âge et des symptômes des malades. Un ensemble des protéines de la fraction salino-soluble ayant des masses moléculaires comprises entre 12 et 70 kDa et la protéine de transfert de lipide de blé (LTP) de 9 kDa ont été également identifiées comme allergènes impliqués dans l'allergie alimentaire. En effet, les  $\omega$ 5-gliadines et SG-HPM sont les allergènes majeurs pour les adultes souffrant d'allergie induite par l'effort et/ou d'anaphylaxie (100 % des cas) ou d'urticaire (53 %) (Battais *et al.*, 2007 ; Juhász *et al.*, 2018).

**Tableau 3.** Allergènes impliqués dans les réactions allergiques médiées par les IgE (Battais *et al.*, 2007 ; Thaon et Penven, 2016 ; Juhász *et al.*, 2018 ).

	Mécanisme	Voie de pénétration	Allergènes
<b>Allergie alimentaire</b>	IgE médié	Orale	Gliadines, gluténines, nsLTP
<b>Anaphylaxie au blé induite par l'effort</b>	IgE médié	Orale	$\omega$ -5 gliadines, SG-HPM
<b>Asthme de boulanger</b>	IgE médié	Respiratoire	nsLTP, ATIs, peroxydase, thiorédoxine, inhibiteur de la sérine protéase, protéine <i>thaumatine-like</i>
<b>Urticaire de contact</b>	IgE médié	Contact avec la peau	SG-HPM, $\omega$ 5 gliadines

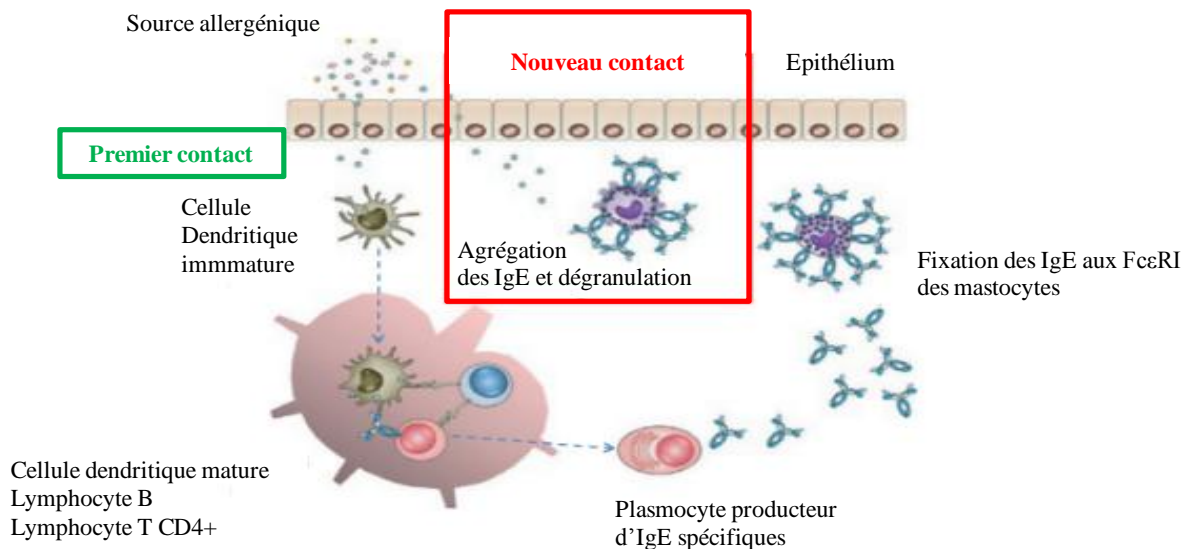
ATIs : inhibiteurs d' $\alpha$  amylases/ inhibiteurs trypsiques, nsLTP : Proteines de transfert de lipides non spécifiques, SG-HPM : Sous Unités Gluténines de Haut Poids Moléculaire.

#### 2.3.4. Physiopathologie

L'allergie alimentaire, l'asthme de boulanger, l'anaphylaxie induite par l'effort et l'urticaire de contact sont des réactions d'hypersensibilité de type I ou immédiates car les symptômes apparaissent rapidement après l'exposition aux allergènes de blé (Arnulf *et al.*, 2018).

Ces réactions allergiques passent principalement par deux étapes (Figure 8) :





**Figure 8.** Physiopathologie de l'allergie immédiate (Abuaf *et al.*, 2018).

Les phases successives de la réaction allergique : phase de sensibilisation (premier contact) et la phase de déclenchement (deuxième contact).

- La première étape est la phase de sensibilisation qui se produit lors du premier contact avec l'allergène. Au cours de laquelle, les IgE spécifiques se produisent et se lient à leurs récepteurs de forte affinité (FcεRI) des mastocytes et des basophiles.
- La deuxième étape est la phase de déclenchement qui survient lors du deuxième contact avec le même allergène. Dans cette étape, l'allergène se lie d'abord avec les IgE spécifiques fixés préalablement sur leurs récepteurs (FcεRI) des mastocytes et des basophiles. Ces dernières transmettent ensuite un signal d'activation cellulaire amplifié rapidement qui provoquent en quelques minutes la dégranulation des granules sécrétoires libérant des substances vasoactives dont principalement l'histamine et la tryptase qui sont responsables de l'apparition des symptômes de l'allergie. Une cascade de signalisations sont également induits par la voie des phospholipides membranaires et l'induction de transcription génique. Ces signalisations sont responsables de l'apparition tardives des symptômes (après quelques heures). Ces symptômes résultent de la libération des produits de dégradation de l'acide arachidoniques de la membrane des granules (prostaglandine, leucotriènes) et la production de cytokine proinflammatoire et chimiokine.

### 2.3.5. Diagnostic

Le diagnostic d'allergie au blé est basé sur les *prick tests* cutanés, les patch tests cutanés, la détection *in vitro* d'IgE spécifiques d'allergènes alimentaires (RAST) et les tests fonctionnels (Bouteloup, 2016; Arnulf *et al.*, 2018).

#### ✓ **Prick tests**

Ces tests sont réalisés pour l'allergie immédiate IgE médiée. Ils consistent en une effraction superficielle de la peau ou du dos avec une lancette ou aiguille à travers une goutte d'antigène préalable déposée sur l'avant-bras ou le dos, les mastocytes cutanés sont immédiatement en contact avec l'antigène. Ces tests ont une faible spécificité (73 %) parce que les antigènes des kits commerciaux ne contiennent qu'un mélange de protéines solubles du blé (Bouteloup, 2016; Arnulf *et al.*, 2018).

#### ✓ **Patch tests**

Ces tests sont réalisés pour l'allergie retardée non IgE médiée. Ils reposent sans effraction sur l'application d'une petite quantité d'antigène à tester sur la peau du dos, sous occlusion, pendant 24 à 48h. L'antigène diffuse à travers la barrière cutanée et peut être reconnu par les lymphocytes T mémoire spécifique. Ces tests sont plus sensibles et plus spécifiques que les *prick tests* (Bouteloup, 2016; Arnulf *et al.*, 2018).

#### ✓ **Test de Radioallergosorbent RAST**

C'est le test de dosage des IgE spécifiques d'un allergène le plus spécifique. Il est plus sensible (83 %) mais moins spécifique (43 %) que les *prick tests* (73 %) en raison, notamment, d'une réactivité croisée avec les pollens de graminées (Bouteloup, 2016; Arnulf *et al.*, 2018)..

#### ✓ **Tests fonctionnels**

Ces tests ont pour but de confirmer le diagnostic. Ils s'appliquent après les tests cutanés et biologiques. Il s'agit des tests de provocation ou de réintroduction qui consistent à introduire la molécule suspecte par la voie habituellement indiquée pour cette dernière (per os, intraveineuse, sous cutanée, cutanée, oculaire ou nasale). Le test d'éviction consiste à exclure les aliments contenant l'antigène en cause (Bouteloup, 2016; Arnulf *et al.*, 2018).

## 2.4. Traitement des pathologies liées au gluten

Le traitement de la maladie cœliaque, la sensibilité non cœliaque au gluten et l'allergie au blé est un traitement diététique à vie c'est le régime sans gluten (RSG) qui consiste à l'exclusion de tous les aliments et les médicaments contenant les trois céréales toxiques (blé, orge et seigle). Ce régime doit être prescrit et contrôlé par un médecin et une diététicienne pour éviter un régime trop riche en graisse ou en sucre souvent consécutif à la consommation exclusive de produits préparés ne contenant pas du gluten et éviter des carences en vitamines, oligo-éléments et minéraux. Pour cela, une supplémentation vitaminique en fer, en folates, en calcium et en vitamine D est nécessaire au début du traitement. Ce régime est contraignant, difficile à suivre en collectivité ou au restaurant mais il est efficace (Tableau 4) (Molkhov, 2007 ; Malamut et Cellier, 2010). Pour les allergiques, un traitement médicamenteux est également prescrit selon le cas. Pour les chocs anaphylactiques et l'angio-œdème, l'injection d'adrénaline est un traitement d'urgence. Pour les autres cas, à l'exception de l'urticaire ou de l'angio-œdème non compliqués, les antihistaminiques et les corticoïdes sont souvent prescrits (Guez *et al.*, 2004).

**Tableau 4.** Efficacité du régime sans gluten (Molkhov, 2007).

<b>Effets du régime sans gluten</b>	<b>Durée</b>
<b><i>Maladie cœliaque</i></b>	
Diminution de syndrome de mal absorption	1 à 3 mois
Amélioration des symptômes classiques (digestifs, anémies, aphtes)	1 à 3 mois
Régression partielle ou complète de la déminéralisation osseuse	Plus de 12 mois
Régression de l'ostéopénie	6 à 12 mois
Négativité des anticorps spécifiques	6 à 12 mois
Repousse des villosités	6 à 24 mois
Amélioration des troubles neurologiques (ataxie, migraine, neuropathie)	imprécis
<b><i>Sensibilité au gluten</i></b>	
Disparition des symptômes	Quelques jours-quelques semaines
<b><i>Allergie alimentaire</i></b>	
Disparition des symptômes	Un jour - quelques jours
Persistance des anticorps spécifiques	/

### Chapitre 3. Méthodes de détoxification du gluten

La détoxification du gluten a fait l'objet de nombreuses études afin d'autoriser aux malades cœliaques de consommer les aliments à base de céréales toxiques (blé, orge et seigle). Plusieurs stratégies ont été suivies pour atteindre cet objectif. Parmi lesquelles, nous citons les méthodes physiques, chimiques et/ou enzymatiques, agronomiques et biotechnologiques.

La principale méthode agronomique consiste à sélectionner les variétés qui contiennent de faibles teneurs en épitopes toxiques (Ribeiro *et al.*, 2018). Les méthodes biotechnologiques sont basées sur la création des variétés génétiquement modifiées OGM par principalement la technologie d'interférences à ARN pour inhiber l'expression du gène codant pour les gliadines (Laursen, 2016).

Dans cette partie, nous n'allons aborder que les méthodes physiques, chimiques et enzymatiques.

#### 3.1. Méthodes physiques

##### 3.1.1. Micro-ondes

Certaines recherches ont étudié l'effet de micro-ondes sur la toxicité du gluten de blé et leurs résultats diffèrent selon les conditions de traitement et la matière première utilisée. L'étude de Lamacchia *et al.* (2016) a porté sur le traitement des graines de blé dur et tendre humidifiées par micro-ondes à 1000 W pendant 2 min et leur transformation en farine. L'analyse ELISA R5 sandwich de la gliadine extraite de cette farine sans une hydrolyse préalable a révélé une réduction importante de l'immunoréactivité (~99%) avec l'anticorps monoclonal R5. Lamacchia *et al.* (2015) ont réussi à détoxifier les graines de blé humidifiées par les micro-ondes (1000W, 2 min). Leur test de cytotoxicité sur des lignées de lymphocytes T prélevées de la muqueuse intestinale des malades cœliaques après digestion et déamidation de gliadine n'a montré aucune production de cytokine inflammatoire et de l'interféron  $\gamma$ , qui sont hautement réactifs avec le peptide 33-mer de l' $\alpha$  gliadine. Cependant Kwak *et al.* (2012) ont étudié l'effet de micro-ondes sur l'immunoréactivité de gliadine extraite d'une pâte à base de blé traitée par micro-ondes à 1000 W pendant différents temps (1, 5 et 10 min). Ils ont démontré que la réactivité avec les anticorps IgG a augmenté significativement en fonction de l'augmentation de temps d'exposition aux rayonnements micro-ondes. Gianfrani *et al.*, (2017) ont également étudié l'effet des micro-ondes sur l'immunoréactivité des graines de blé

, dur et tendre, traités par micro-ondes en changeant plusieurs paramètres : volume de l'eau de trempage (100 et 500 mL), temps de trempage (1 min, 1h et 2h) , puissance des micro-ondes (600 et 1000 W) et le temps d'expositions aux micro-ondes (2, 3, 5 et 6 min). Leur résultat du test *in vitro* de la cytotoxicité a indiqué que le traitement micro-ondes n'est pas efficace pour détoxifier le gluten dans leurs conditions opératoires.

### 3.1.2. Lumière pulsée

La lumière pulsée est une technologie non thermique basée sur l'application des séries d'impulsions lumineuses très courte est très puissante de large spectre allant des ultraviolets aux rayonnements électromagnétiques proche infrarouges. Cette technologie est utilisée dans l'industrie Agro-Alimentaire pour inactiver les agents pathogènes et altérer les micro-organismes. Son utilisation est en augmentation grâce à ses nombreux avantages tels que l'efficacité pour l'inactivation des agents pathogènes, le temps de traitement très court, le faible coût énergétique et le manque de composés résiduels (Oms-Oliu *et al.* , 2010).

L'essai de détoxification du gluten par la lumière pulsée a été investigué par Panozzo *et al.* (2016). Ils ont traité le gluten sous deux formes, poudre et en suspension dans un tampon phosphate à pH 6,9 contenant 0,05% de SDS, par la lumière pulsée à différents flux lumineux (8,75, 17,5 et 26,25 J/ cm<sup>2</sup>) pendant 0,5  $\mu$ s. L'analyse ELISA sandwich R5 de gliadine extraite des glutens traités a montré une forte diminution de l'immunoréactivité (50%) du gluten en suspension traité à 26,25 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.2. Méthodes enzymatiques

La caractéristique qui rend le gluten toxique et immunogénique chez les malades cœliaques est sa richesse en glutamine (30 à 35%) et en proline (10 à 15%) qui sont résistants à la digestion protéolytique pancréatique, gastrique et intestinale, ce qui assure la persistance des épitopes immunostimulants (Ribeiro *et al.* ,2015). Plusieurs méthodes enzymatiques ont été utilisées pour diminuer la toxicité du gluten. Ces méthodes visent à hydrolyser les épitopes toxiques. Pour cela, l'utilisation des enzymes protéolytiques résistantes à la digestion enzymatique au niveau du tractus gastro-intestinal a été investigué pour éliminer la toxicité du gluten de blé et des autres céréales toxiques.

De nombreuses études ont utilisé des enzymes à activité protéolytiques afin d'éliminer les peptides immunogéniques du gluten avant ingestion ou co-administartion en parallèle avec l'ingestion des aliments contenant le gluten.

Shan *et al.* (2002) ont prouvé que les enzymes propyl endopeptidase ont la capacité de cliver le peptide 33-mer *in vitro* et *in vivo*. En outre, Shan *et al.* (2004) ont montré que trois types de propyl endopeptidases d'origine bactérienne résistantes aux conditions acides, les protéases pancréatique et les peptidases membranaires sont efficaces pour inactiver les peptides qui provoquent la réponse immunitaire chez les patients cœliaques. Piper *et al.* (2004) et Marti *et al.* (2005) ont démontré également que les endopeptidases propyl diminuent la concentration en peptides antigéniques dans l'intestin. Bethune *et al.* (2006) ont trouvé que les enzymes endoprotéases cystéine peuvent inactiver les peptides antigéniques grâce à leur résistances aux conditions acides et leur capacité à digérer les gliadines notamment le peptide 33-mer. De plus, ces enzymes, endoprotéases cystéine, sont capables de cliver la séquence reconnue par la transglutaminase tissulaire. Gass *et al.* (2006) ont rapporté que les endoprotéases de l'orge ont la capacité de dégrader les peptides du gluten résistants à la protéolyse.

Wolf *et al.* (2015) ont développé une enzyme endopeptidase de gliadine appelée Kuma 030 qui a montré une grande efficacité pour la dégradation des peptides immunogéniques de blé, de l'orge et de seigle et par conséquent la diminution de la stimulation des cellules T. Cette enzyme est capable de dégrader complètement 4 à 8 g du gluten pendant 30 min dans un modèle de digestion gastrique.

Siegel *et al.* (2012) et Lahdeaho *et al.* (2014) ont démontré que l'administration d'un mélange de deux endopeptidases nommé ALV003 (Endopeptidase glutamine de l'orge EP-2 et endopeptidase propyl de *Sphingomonas capsulate* PEP) diminue les lésions intestinales chez les malades cœliaques avec ces proportions : gluten / EP-2 / PEP, 75 :3 :1 (p/p/p).

La fermentation des farines de blé, de seigle et de l'orge par *Lactobacilli* levain sélectionné, qui possède un système complexe de peptidases, diminue significativement la toxicité du gluten. Néanmoins, cette méthode supprime complètement les propriétés technofonctionnelles du gluten (Wieser et Koehler, 2012).

Cependant, ces méthodes enzymatiques ont certains inconvénients. Le traitement enzymatique de la farine et du gluten avant ingestion fait perdre les propriétés viscoélastiques du gluten et par conséquent affecte les interactions protéiques et la formation du réseau gluténique. Alors que, la co-administration des enzymes nécessitent de déterminer les quantités exactes du gluten et de l'enzyme ingérées afin d'assurer une digestion très rapide

pour garder une quantité du gluten inférieure à 10 mg pour éviter les lésions intestinales (Ribeiro *et al.* , 2018).

### 3.3. Méthodes combinées

#### 3.3.1. Méthodes chimio-enzymatiques

Les méthodes de transamidation consistent à utiliser la transglutaminase en présence d'amines nucléophiles spécifiques tels que L-Lysine, L-Lysine méthyle ou éthyle esters avant ingestion pour bloquer l'étape clé de la physiopathologie de la maladie cœliaque, la reconnaissance et la déamidation des résidus de glutamine par transglutaminase tissulaire. Mazzarella *et al.* (2012) ont fabriqué un pain à partir de farine de blé transamidé par la transglutaminase d'origine microbienne en présence d'ester de méthyle éthyle et la réduction de protéines immunogéniques a atteint 94% chez certains malades seulement.

Ribeiro *et al.* (2015) ont réduit la toxicité du gluten par transamidation de farine de blé par transglutaminase d'origine microbienne en présence de n-butylamine dans des conditions réductrices (en présence de glutathion).

Gianfrani *et al.* (2007) ont réduit l'expression des interférons  $\gamma$  dans les lignées cellulaires par transglutaminase d'origine microbienne en présence de L-Lysine. Cependant l'utilisation de L- lysine ou ses dérivées ester comme amine nucléophile peut avoir un effet négatif sur les propriétés viscoélastiques à cause de la modification de la charge du gluten (Ribeiro *et al.* , 2015).

#### 3.3.2. Méthodes chimique, mécanique et physique

Rahman *et al.* (2016) ont combiné entre trois facteurs environnementaux différents pour étudier leurs effets sur la toxicité du gluten : pH, vitesse de déformation et température. Le traitement consiste à solubiliser la poudre du gluten dans des tampons ayant différents pH (3, 5 et 7) , de les soumettre à différentes vitesses de déformation (500, 1000 et 1500 s<sup>-1</sup>) et les chauffer à hautes températures (80, 90 et 100°C). Les résultats ont montré que le traitement du gluten solubilisé dans un tampon à pH 3 chauffé à 90°C réduisait la toxicité du gluten jusqu'à 30%.

# *Matériel et méthodes*



## **Démarche générale de la thèse**

Le présent travail vise à étudier les effets de certains traitements physiques sur le gluten de blé en vue de diminuer ou supprimer son immunoréactivité tout en préservant ses propriétés fonctionnelles afin d'améliorer la qualité de vie des malades algériens souffrant de la maladie cœliaque. La matière première utilisée dans cette étude est une poudre du gluten vu sa large application dans l'industrie Agro-alimentaire et pharmaceutique pour ses nombreuses propriétés fonctionnelles (propriétés visqueuse, élastique, extensible, moussante, émulsifiante et gélifiante). Par ailleurs, à notre connaissance, aucune recherche n'a été menée sur cette problématique.

Pour atteindre ces objectifs, deux traitements thermiques ont été appliqués : la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et les Micro-ondes (MO). La DIC a été choisie sur la base des résultats prometteurs des études précédentes sur la diminution de l'allergénicité de certaines protéines d'origine animale et végétale. Ainsi que, le traitement Micro-ondes a été choisi sur la base de son faible coût, sa disponibilité et son efficacité sur la réduction de l'immunoréactivité et la toxicité des graines de blé selon une étude italienne récente.

La figure 9 représente un schéma récapitulatif des deux parties de la thèse. Dans la première partie, nous avons traité la poudre du gluten par la DIC selon un premier plan CCD et nous avons étudié les changements induits par la DIC sur le plan structural, fonctionnel et immunologique. Dans la même partie et dans le but de confirmer l'effet de la DIC sur l'immunoréactivité du gluten, un deuxième plan CCD, plus intense, a été appliqué sur la poudre de gluten et le pain à base de blé, en tant qu'aliment préféré et fréquemment consommé par les malades, pour quantifier les épitopes potentiellement toxiques.

Dans la deuxième partie où la poudre du gluten a été traitée par les Micro-ondes selon un plan CCD, une étude plus approfondie a été réalisée. En plus de l'étude de la structure, des propriétés fonctionnelles et immunologiques, une étude à l'échelle moléculaire a été effectuée.

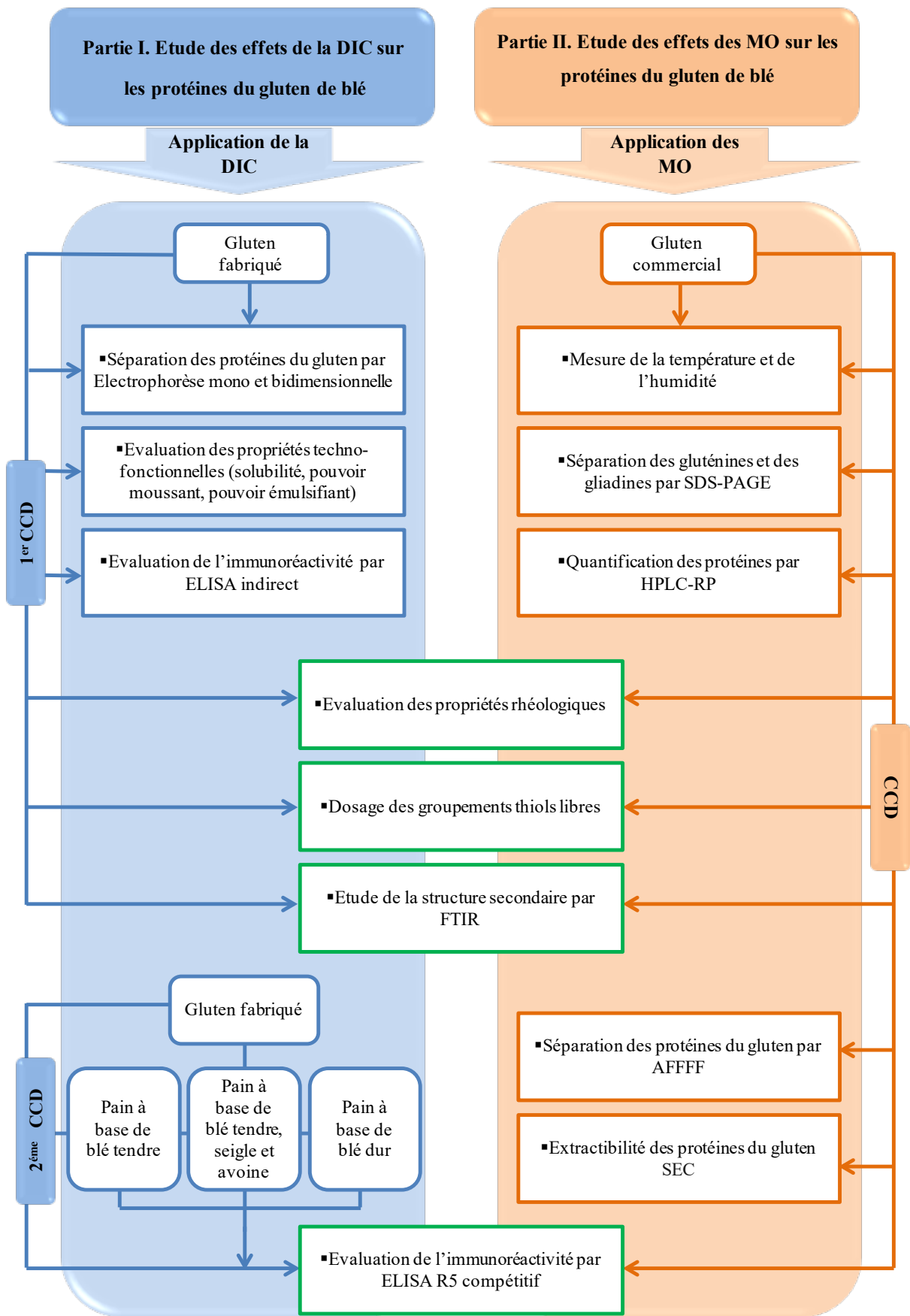
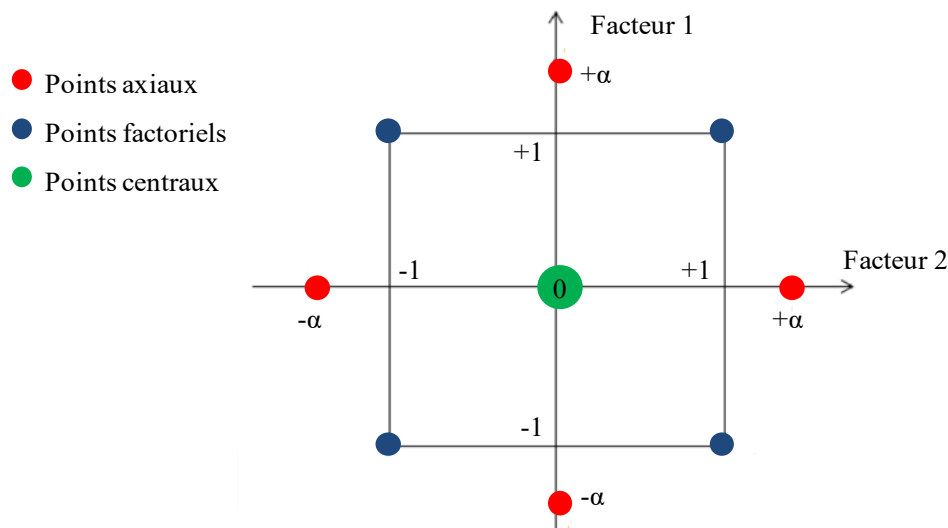


Figure 9. Schéma général de la thèse.

## Approche expérimentale

L'outil mathématique utilisé pour étudier les effets de ces traitements physiques sur le gluten de blé est la méthodologie de surface de réponse (MSR). Il s'agit d'une stratégie de planification expérimentale et d'une régression multiple utilisées pour analyser des problèmes dans lesquels plusieurs facteurs peuvent influencer sur une réponse afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique (Gardiner et Gettinby, 1998 ; Dagnelie, 2000). Nous avons choisi le plan d'expérience composite centré (*Central Composite Design CCD*) qui est le plan du deuxième degré le plus utilisé de cette méthodologie. Ce plan nous permet de révéler les effets linéaires et d'interaction ainsi que les effets quadratiques avec un minimum d'essais. Un plan d'expérience composite centré pour  $m$  facteurs est constitué de trois parties (Figure 10 et tableau 5):

- la partie factorielle contenant tous les sommets du cube  $[-1, +1]^m$  ( $2^m$ ) ;
- la partie axiale contenant tous les points situés sur les axes du repère à une même distance  $\alpha$  du centre du domaine expérimental  $[-\alpha, +\alpha]^m$  ( $2*m$ ) ;
- la partie centrale contenant  $n_0$  éventuelles répliques du centre du domaine expérimental.



**Figure 10.** Schéma d'un plan d'expérience composite centré à deux facteurs et cinq niveaux.

Les facteurs impliqués dans les présents plans sont au nombre de deux (température (°C) et temps de traitement (s) pour la DIC et puissance (W) et temps de traitement (s) pour les Micro-ondes). Selon Khuri et Mukhopadhyay (2010), le nombre total des essais est  $n = 2^m + 2*m + 5 = 2^2 + 2*2 + 5 = 13$  essais. La matrice de ce plan est mentionnée dans le tableau 5.

**Tableau 5.** Matrice du plan composite centré à deux facteurs et cinq niveaux.

Essai	Partie du plan	Code du facteur 1	Code du facteur 2
1		-1	-1
2	Partie factorielle	+1	-1
3		-1	+1
4		+1	+1
5		$-\alpha$	0
6	Partie axiale	$+\alpha$	0
7		0	$-\alpha$
8		0	$+\alpha$
9		0	0
10	Partie centrale	0	0
11		0	0
12		0	0
13		0	0

Les réponses étudiées sont exprimées en fonction des facteurs ou variables selon l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Où :

Y: réponse

$X_1, X_2$  : variables indépendantes ou facteurs

$\beta_0$ : constante

$\beta_1$  et  $\beta_2$ : coefficients de régression linéaire

$\beta_{11}$  et  $\beta_{22}$ : coefficients de régression quadratique

$\beta_{12}$ : coefficient d'interaction de régression

## 1. Matières premières

### 1.1. Farine de blé tendre

La farine de blé tendre utilisée pour l'extraction du gluten est une farine panifiable sans additifs conditionnée dans un sac de 5 Kg. Elle est achetée du commerce et provient des grands moulins Kenza.

## 1.2. Gluten de blé

### 1.2.1. Gluten fabriqué

Le gluten de blé utilisé dans la première partie a été extrait à partir de la farine de blé tendre. Une masse de 300 g de farine a été mélangée avec 160 mL de NaCl 0,4M. La pâte formée a été homogénéisée pendant 5 min dans un pétrin. Après 8 min de repos, la pâte obtenue a été lavée par la même solution salée (NaCl 0,4M) jusqu'à l'obtention d'une masse viscoélastique qui est le gluten humide. Ce dernier a été lavé par l'eau déionisée pour éliminer le sel, puis séché pour obtenir le gluten sec (Wang et *al.*, 2014). Finalement, pour avoir une poudre homogène, le gluten sec a été broyé, à l'aide d'un moulin à café, et tamisé.

### 1.2.2. Gluten commercial

Dans la deuxième partie, nous avons utilisé un gluten commercial au lieu du gluten fabriqué en raison de certaines difficultés rencontrées lors de la préparation du gluten extrait à partir de la farine de blé principalement le séchage et le broyage. Le séchage du gluten était difficile à cause de sa grande capacité d'hydratation ce qui peut favoriser le développement des microorganismes durant le séchage. Le broyage était également difficile à cause de la dureté du gluten sec et la perte des quantités importantes pendant le tamisage.

Le gluten commercial utilisé est une poudre fine du gluten vital fournie par l'entreprise PPlus Ingrédients (Alger, Algérie) (Annexe 1). Ce gluten a la composition suivante : 80% de protéines, 6% de l'eau, 1% de minéraux, 7% de lipides totaux, 9% de l'amidon et moins de 1% de cellulose.

## 1.3. Pains à base de blé

Trois types de pain ont été utilisés dans la première partie. Les deux premiers types de pain ont été préparés au laboratoire. Le premier type a été préparé à partir de semoule de blé dur, huile d'olive, eau, sel et levure. Le deuxième type a été préparé à partir de farine de blé tendre, eau, sel et levure. Le dernier type a été acheté du commerce et est à base d'un mélange de céréales toxiques (blé tendre, avoine et seigle).

## 1.4. Sérums sanguins

Plus de cent sérums des malades cœliaques algériens provenant du laboratoire d'analyse Ibn Sina (Combattants – Constantine) ont été collectés tout au long d'une année et demie. Ces sérums sont positifs pour les anticorps les plus spécifiques de cette maladie, d'isotype

IgA et IgG, qui sont les anticorps anti-transglutaminase (> 20 UR/mL), anti-endomysium (> 1/10) et anti-gliadine (> 25 UR/mL). Cependant, seulement trois sérums ayant des concentrations élevées en anticorps IgA anti-gliadines (> 2000 UR/mL) ont été utilisés dans ce travail à cause de manque de réactifs. Ces malades ont présentés des symptômes extra et intra-digestifs qui sont mentionnés dans le tableau 6. Les sérums ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

**Tableau 6.** Caractéristiques cliniques et sérologiques des malades cœliaques diagnostiqués.

Patient	Sexe	Âge	Symptômes cliniques	Concentration des anticorps spécifiques	
				AAG (UR/mL)	AATG (UR/mL)
P1	Féminin	24	Diarrhée, Anémie, Ostéoporose, douleurs abdominales, perte de poids, faiblesse	[IgA] > 2000 [IgG] = 700	[IgA] > 2000 [IgG] = 6,20
P2	Féminin	7	Diarrhée, retard de croissance, vomissement, fonte musculaire	[IgA] > 2000 [IgG] = 830	[IgA] > 2000 [IgG] = 6,40
P3	Masculin	17	Diarrhée, Anémie, douleurs abdominales, perte de poids, faiblesse	[IgA] > 1900 [IgG] = 800	[IgA] > 1900 [IgG] = 6

AAG: anticorps anti-gliadine, AATG: anticorps anti-transglutaminase

## 2. Etude des effets de la DIC sur les protéines du gluten de blé

### 2.1. Caractérisation physicochimique de la farine et du gluten de blé

#### 2.1.1. Teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée selon la méthode décrite par la norme AFNOR NFV03-707 (AFNOR, 1991). Cette méthode consiste à sécher l'échantillon dans l'étuve (Memmert, UM 200, Allemagne) à une température de 130°C jusqu'à poids constant. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{(P0 - P1)}{P0} \times 100$$

Où :

H% : teneur en eau (%)

P<sub>0</sub>: poids initial de l'échantillon (g)

P<sub>1</sub> : poids sec de l'échantillon (g)

La teneur en eau calculée est utilisée pour juger la qualité hygiénique des matières premières et pour déterminer les teneurs des autres composants par rapport à la matière sèche en multipliant chaque teneur par un coefficient de 100/(100-H).

### 2.1.2. Teneur en matière grasse libre

La teneur en matière grasse libre est déterminée selon FAO (1996), avec l'appareil SOXTEC HT (VELP SCIENTIFICA, SER148). Dans cette méthode, la matière grasse est extraite par un solvant organique apolaire « hexane » dans l'unité d'extraction, en deux étapes. Dans la première étape, l'échantillon est immergé dans le solvant en ébullition et la plupart des matières solubles sont extraites. Dans la deuxième, l'échantillon placé au dessus du solvant est rincé par ses vapeurs. Après l'extraction et l'évaporation du solvant, sa récupération est réalisée en balayant le système avec de l'air provenant de module thermostat et la matière grasse libre est récupérée et pesée. La teneur en matière grasse libre (MG) est donnée par la formule suivante :

$$MG(\%) = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$

Avec :

P<sub>0</sub> : poids initial de l'échantillon (g)

P<sub>1</sub>: poids de matière grasse récupérée (g)

### 2.1.3. Teneur en protéines totales

Le dosage des protéines est fait par la méthode de Kjeldahl selon les directives de la norme AFNOR NF-V03-050 (AFNOR, 1991). Cette méthode consiste à transformer l'azote organique en sulfate d'ammonium en solution par l'acide sulfurique et un catalyseur à chaud. Après alcalinisation, l'ammoniac obtenu à la vapeur d'eau est titré par l'acide sulfurique. Le taux de protéines (P) est donné par la formule suivante :

$$P(\%) = \frac{14 \times N \times D \times V \times K}{P_0 \times 1000} \times 100$$

Où :

14 : masse atomique de l'azote (g)

N : normalité de l'acide sulfurique

D : coefficient de dilution de l'échantillon

V : volume de l'acide sulfurique utilisé pour le titrage (mL)

P<sub>0</sub> : poids de l'échantillon (g)

K : coefficient de conversion (5,7 pour les céréales)

#### **2.1.4. Teneur en cendres**

La détermination de la teneur en cendres a été réalisée selon la méthode décrite par la norme AFNOR NF V03-720 (AFNOR, 1991). Cette méthode est basée sur l'incinération de l'échantillon à une température de 900°C ± 25°C dans une atmosphère oxydante, jusqu'à l'obtention d'un résidu incombustible, à aspect blanc après refroidissement, qui représente les cendres. La teneur en cendres (C) est mesurée selon la formule ci-dessous :

$$C (\%) = \frac{P_1}{P_0} \times 100$$

Où :

P<sub>0</sub> : poids initial de l'échantillon (g)

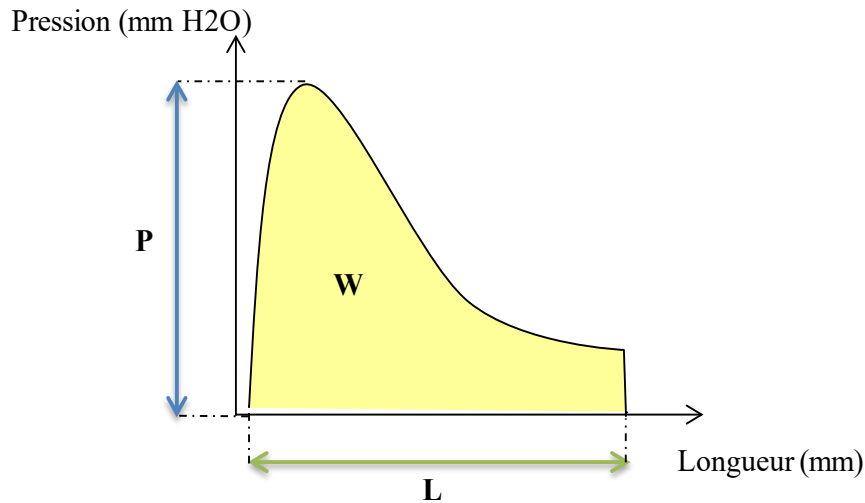
P<sub>1</sub> : poids de cendres (g)

## **2.2. Caractérisation rhéologique de la farine de blé tendre**

Le test à Alvéographe permet l'étude des propriétés rhéologiques d'une pâte afin de déterminer la force boulangère d'une farine. Ce test a été réalisé selon la norme ISO 5530-4. Il consiste à mesurer le travail de la déformation d'un pâton sous pression qui ressemble à celui qui s'exerce au cours de la fermentation et de l'expansion des alvéoles de gaz dans la pâte pendant la fermentation, sous la pression de gaz carbonique et la cuisson (Godon et Guinet, 1994 ; Feillet, 2000).

Les paramètres mesurés dans ce test sont mentionnés dans la figure 11, où :





**Figure 11.** Courbe d'Alvéographe Chopin.

P : Ténacité, L : Extensibilité, W : Force boulangère

**W** : c'est la surface sous la courbe. Il représente le travail de déformation de la pâte testée jusqu'à sa rupture et il exprime la force boulangère de la farine, mesuré en Joule.

**L ou G** : c'est l'extensibilité de la pâte correspond au gonflement maximal avant que la bulle de pâte n'éclate. Le gonflement est mesuré en  $\text{cm}^3$ .

**P** : pression maximale ou l'élasticité, c'est la résistance maximale de la pâte à la déformation, elle est liée à la ténacité de la pâte mesurée en  $\text{mm H}_2\text{O}$ .

**P/L** : c'est le rapport de configuration Ténacité / Extensibilité. Il donne une indication sur l'équilibre entre ces deux caractères de la pâte.

## 2.3. Application du traitement DIC

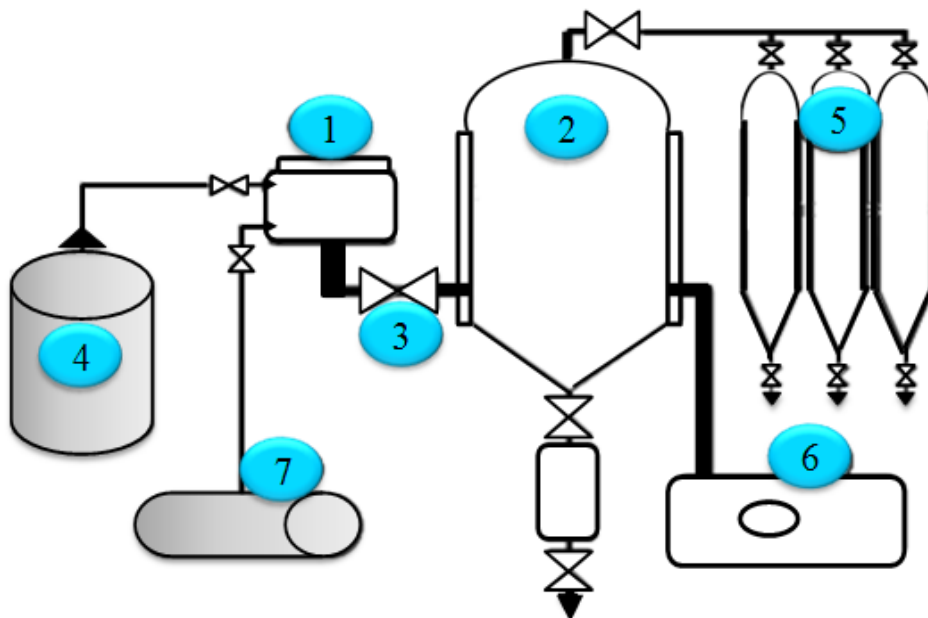
### 2.3.1. Définition de la DIC

La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) est un traitement thermique de type Haute Température Courte Durée HTST (*High Temperature Short Time*). Elle repose sur l'exposition d'un produit partiellement humide à une pression de vapeur ( $P < 10 \text{ bar}$ ) à haute température ( $< 180^\circ\text{C}$ ) pendant une courte durée suivie par une chute instantanée de pression vers le vide ( $3\text{-}5 \text{ kPa} / \Delta t \text{ } 20\text{-}200 \text{ ms}$ ) (Allaf *et al.*, 2012). Le procédé est bien contrôlé à divers niveaux de température ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), de haute pression ( $\pm 0,01 \text{ MPa}$ ), de pression du vide ( $\pm 100 \text{ kPa}$ ) et de durée de l'opération ( $\pm 2 \text{ s}$ ).

### 2.3.2. Appareillage

Dans la présente étude, l'appareil DIC utilisé est un réacteur (Figure 12) composé principalement de:

- une chambre de traitement de haute température (de l'ambiante à 200°C) et/ou de haute pression (de 0,1 à 1MPa), de vapeur d'eau et/ou d'air comprimé. Elle est de forme cylindrique de 22 cm de diamètre et de 12 litres de volume. Elle est munie des vannes qui contrôlent le débit de vapeur et d'air comprimé ;
- un système de connexion qui permet d'obtenir la chute de pression vers le vide en une durée inférieure à 100 ms. C'est une vanne sphérique électropneumatique qui assure une connexion instantanée entre la chambre de traitement et le réservoir à vide ;
- un système à vide : il s'agit d'un réservoir à vide de 1600 litres lié à une pompe à vide assurant un niveau de vide compris entre 2,5 et 5 kPa ;
- un système d'acquisition et de commande automatique qui est formé d'un système de capteurs, de cartes électroniques et de logiciel d'acquisition permet l'acquisition et le stockage des données sur un ordinateur (Ben Amor, 2008; Albitar, 2010).

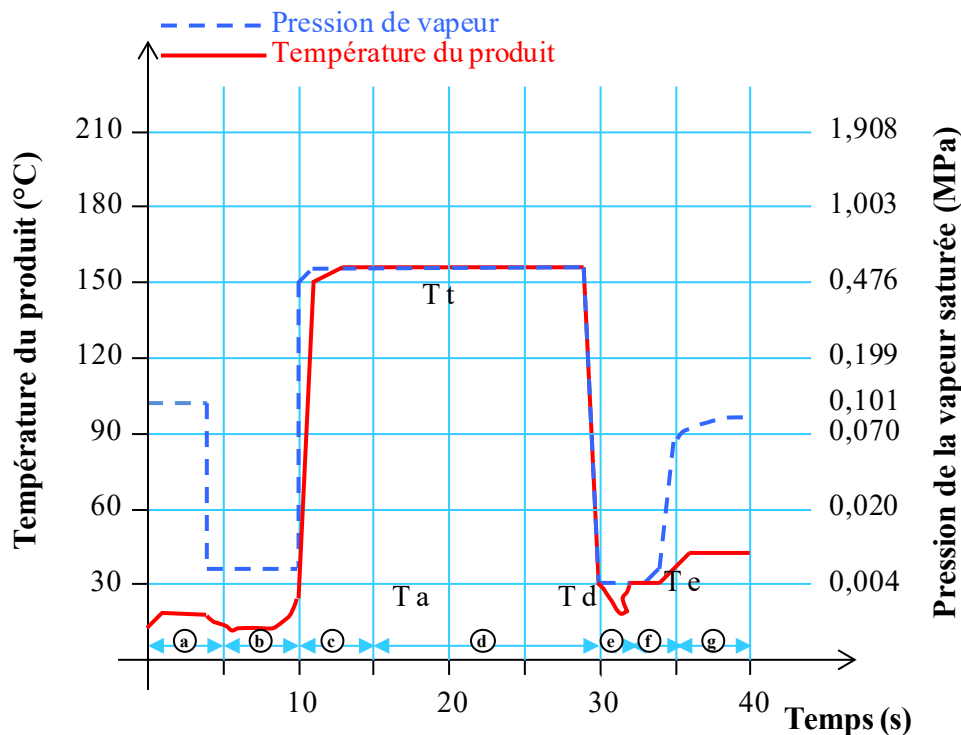


**Figure 12.** Schéma d'un réacteur de la DIC (Albitar, 2010).

1/Chambre de traitement, 2/Réservoir de vide, 3/Valve de la détente instantanée contrôlée,  
4/Générateur de vapeur, 5/ Condenseur, 6/Pompe à vide, 7/Compresseur d'air

### 2.3.3. Fonctionnement

La DIC passe par plusieurs étapes (Figure 13), dont la première est la mise sous vide, qui consiste à instaurer un vide préliminaire dans l'enceinte de traitement pour assurer un contact très intime entre la surface du produit et la vapeur d'eau. Dans la deuxième étape, la pression de vapeur d'eau est injectée pour assurer une température contrôlée du produit ( $T < 200^{\circ}\text{C}$ ,  $P < 20$  bars) pendant un temps court (quelques dizaines de secondes). Après le traitement du produit, une détente instantanée de pression vers le vide se fait en quelques dixièmes de secondes. Cette étape a pour but de refroidir le produit qui a perdu par auto-vaporisation une partie de son eau. Une induction éventuelle d'une expansion du produit est possible durant cette étape. Dans la dernière étape, la pression revient à la pression atmosphérique (Albitar, 2010 ; Allaf *et al.*, 2012).



**Figure 13.** Étapes du traitement DIC (Allaf *et al.*, 2012).

a : pression atmosphérique, b : vide initial, c : injection de vapeur saturée, d : maintien de la pression de vapeur saturée et température de traitement constante, e : détente abrupte vers le vide, f : maintien de vide, g : retour à la pression atmosphérique. Ta: température de l'air, Td : température de détente, Te : température de l'échantillon, Tt : température de traitement.

### 2.3.4. Conditions de l'application du traitement DIC

Le traitement DIC a été appliqué selon deux plans expérimentaux composites centrés à deux facteurs, la température (°C) ( $X_1$ ) et le temps de traitement (s) ( $X_2$ ), et à cinq niveaux  $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ .

Des essais préliminaires ont été faits pour fixer le niveau inférieur ( $-\alpha$ ) et le niveau supérieur ( $+\alpha$ ) pour chaque facteur. Deux plans CCD ont été appliqués. Les cinq niveaux pour chaque facteur, des deux plans, sont mentionnés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Niveaux expérimentaux des deux variables indépendantes des plans expérimentaux composites centrés de la DIC.

Variables indépendantes	Symboles mathématiques	Valeurs codées et réelles				
		-1,414	-1	0	+1	+1,414
Température (°C)	$X_1$	100	109,1	132,5	155,5	165
Temps (s) (CCD1)	$X_2$	20	25,9	40	54,1	60
Temps (s) (CCD2)	$X_2$	40	51,71	80	108,28	120

Le tableau 8 donne la matrice du premier plan CCD établie par le logiciel statistique Minitab (Version 13.31, Inc, PA 16801, USA).

**Tableau 8.** Matrice du premier plan expérimental composite centré du traitement DIC.

Essai	Codes		Température (°C) ( $X_1$ )	Temps (s) ( $X_2$ )
	$X_1$	$X_2$		
1	0	0	132,5	40
2	+1,414	0	165	40
3	0	+1,414	132,5	60
4	0	0	132,5	40
5	+1	+1	155,5	54,1
6	+1	-1	155,5	25,9
7	0	0	132,5	40
8	-1	-1	109,1	25,9
9	-1	+1	109,1	54,1
10	0	0	132,5	40
11	-1,414	0	100	40
12	0	-1,414	132,5	20
13	0	0	132,5	40

Les échantillons de la poudre du gluten et des morceaux de trois types de pains à base de blé et d'autres céréales toxiques ont été traités par la DIC selon des conditions de traitements plus accentuées (Tableau 9) en raison de la diversité de la réponse immunologique des malades. Les échantillons traités selon ce plan ont été analysés seulement par ELISA R5 compétitif et ce dans le but de confirmer l'effet de la DIC sur l'immunoréactivité du gluten.

**Tableau 9.** Matrice du deuxième plan expérimental composite centré du traitement DIC.

Essai	Codes		Température (°C) (X1)	Temps (s) (X2)
	X1	X2		
1	-1	+1	109,519	51,716
2	+1	-1	155,481	51,716
3	+1	+1	109,519	108,284
4	0	0	155,481	108,284
5	0	0	100	80
6	0	0	165	80
7	0	0	132,5	40
8	-1	-1	132,5	120
9	-1,414	0	132,5	80
10	+1,414	0	132,5	80
11	0	-1,414	132,5	80
12	0	+1,414	132,5	80
13	0	0	132,5	80

#### 2.4. Séparation des protéines du gluten par SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) est utilisée pour séparer les protéines du gluten non traité et traités par la DIC selon leurs poids moléculaires en conditions dénaturantes. Le détergent anionique SDS dénature les protéines et leurs confère une charge négative et l'agent réducteur  $\beta$  Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) coupe les ponts disulfures. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines chargées migrent vers l'anode à une distance dépendant de leurs tailles moléculaires (Sine, 2003). L'électrophorèse SDS-PAGE des protéines du gluten est réalisée selon le protocole de Laemmli (1970) suivant le mode d'emploi de Mini-PROTEAN 3Cell (BioRad) en utilisant un gel de concentration de 6% et un gel de séparation de 12% (Annexe 2). Une quantité de 3 mg

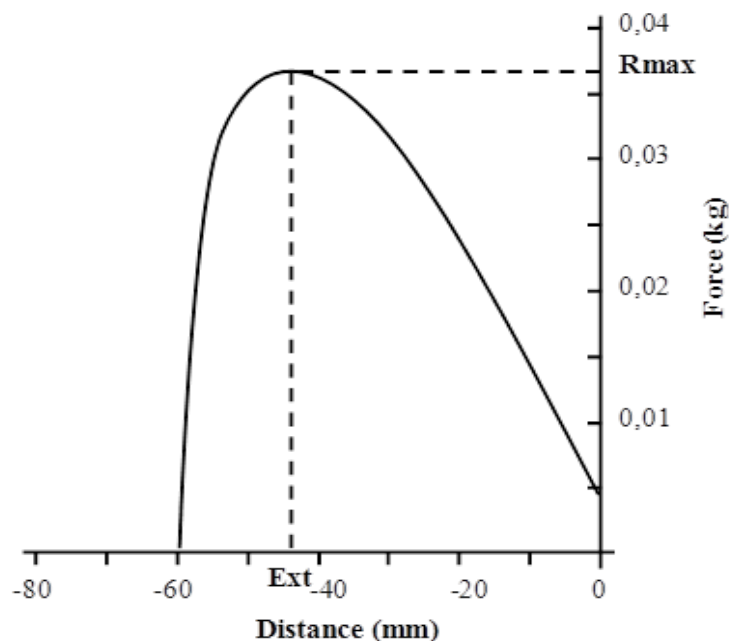
de chaque échantillon est extraite par 300  $\mu$ L de tampon de l'échantillon de Laemmli x2 contenant  $\beta$ -ME (65,8 mM Tris-HCl pH 6,8 ; glycérol 26,3% (v/v) ; SDS 2,1% (p/v) ; bleu de Bromophénol 0,01% (p/v);  $\beta$ -ME 5% (v/v)) puis chauffé pendant 3 min dans un bain marie et la même quantité (4  $\mu$ L) des échantillons est chargée sur le gel. La séparation des protéines du gluten est effectuée sur un gel de séparation de 12 % à 200 Volt pendant 65 min à température ambiante dans un système vertical d'électrophorèse (Hoefler, SE600, San Francisco, CA, USA). Après migration, les protéines séparées sont fixées sur le gel par l'acide trichloracétique TCA à 20% pendant 20 min puis le gel est trempé dans le liquide de lavage (acide acétique et éthanol) trois fois pendant 10 min. La coloration des gels est réalisée par le Bleu de Coomassie R-250 (Reanal, Hongrie) et la décoloration est faite par l'acide acétique à 10%. L'imagerie des gels a été faite par BioRad Gel Doc 2000 system.

## 2.5. Séparation des protéines du gluten par électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est réalisée selon le protocole de Laemmli (1970) et Hajós *et al.* (1995). Elle consiste à séparer les protéines selon leurs points isoélectriques et leurs masses moléculaires (Durand et Beaudoux, 2011). La première dimension, focalisation isoélectrique, a été menée dans une bandelette de gradient immobilisé (bande IPG, 7 cm) de pH compris entre 3 et 10 en utilisant une chambre de focalisation isoélectrique (PROTEAN IEF Cell, BioRad). Une masse de 0,6 mg de chaque échantillon utilisée est solubilisée dans 250  $\mu$ L de tampon de réhydratation (8 M urée, CHAPS 1% (p/v), 0,02 M DTT) avec 600  $\mu$ L de l'huile minérale (BioRad) placée à la surface supérieure afin d'éviter la déshydratation. Ensuite, la focalisation isoélectrique (FIE), a été réalisée par une augmentation linéaire de voltage de 250 V à 24000 V. Après avoir atteint l'équilibre, chaque bandelette a été incubée dans 1,5 mL de solution d'équilibration [Dans les premières 15 min à température ambiante dans le tampon I : 6 M urée, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), DTT 2% (p/v), SDS 2% (p/v), glycérol 20% (v/v) et dans les deuxièmes 15 min à température ambiante dans le tampon II : 6 M urée, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), iodo-acétamide 2,5% (p/v), SDS 2% (p/v), glycérol 20% (v/v)] et secouée doucement avant d'être transférée à la deuxième dimension. Pour cette dernière, la séparation des protéines a été réalisée par SDS-PAGE en couche mince (75 mm\_83 mm\_1,5 mm) par l'utilisation de Mini -PROTEAN II cell (BioRad). La concentration en acrylamide total de gel de séparation est de 12%. Seuls le gluten non traité et les glutens 1,2, et 11 qui correspondent respectivement aux glutens traités à (132,5°C, 40 s), (165°C, 40s) et (100°C, 40 s) ont été analysés par électrophorèse bidimensionnelle. Les échantillons ont été choisis sur la base de la température de traitement. L'imagerie des gels a été faite par BioRad Gel Doc 2000 system.

## 2.6. Détermination des propriétés rhéologiques

Les tests de microextension sur le gluten réhydraté sont faits en utilisant un analyseur de Texture TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, Royaume Uni) ajusté pour l'extensibilité de pâte et du gluten SMS/Kieffer. Une masse de 5 g de chaque échantillon, gluten témoin et glutens traités, est réhydratée par 10 mL d'eau distillée à 20°C pendant 15 min. La pâte du gluten obtenue est centrifugée à 5000 g pendant 10 min pour éliminer l'excès d'eau (Kieffer *et al.*, 2007). Après 20 min de repos à 30°C sous atmosphère saturée, le gluten humide est gratté par l'huile de paraffine, pour éviter l'adhésion, pressé dans un moule à teflon préchauffé à 30°C, et laissé reposer pendant 40 min à 30°C sous atmosphère saturée puis analysé. Ce test mesure la résistance maximale à l'extension (Rmax) et l'extensibilité totale (Ext) du gluten (Figure 14) (Ribeiro *et al.*, 2015).



**Figure 14.** Courbe du test de la rhéologie.

Ext : Extensibilité totale, Rmax : Résistance maximale à l'extension

## 2.7. Détermination de la teneur en groupements thiols libres

La teneur en groupements thiols libres du gluten non traité et des glutens traités par la DIC est mesurée par colorimétrie en utilisant l'acide 5,5'-Dithiobis 2-Nitrobenzoïque (DTNB), selon la méthode de Jansens *et al.* (2011) avec quelques modifications (Rahaman *et al.*, 2016). Des solutions à 2 mg/mL sont préparées dans le tampon d'échantillon [Tampon phosphate 0,05M, pH 6,5 contenant 2% de SDS (p/v), 3M urée et 1 mM EDTA]. Chaque

dispersion est laissée reposer pendant 1h avec une agitation discontinue chaque 15 min par vortex. Ensuite, 400  $\mu\text{L}$  de réactif de DTNB [0,1 % DTNB dans le tampon d'échantillon (p/v)] sont ajoutés, le mélange est alors incubé pendant 45 min avec agitation discontinue par vortex et centrifugé à 3000 g à température ambiante pendant 10 min. Le surnageant collecté est filtré sur un papier filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ . Finalement, l'absorbance de filtrat est mesurée à 412 nm en utilisant un spectrophotomètre UV (Libra S11, Biochrom). La teneur en groupements thiols libres, exprimée par  $\mu\text{mol/g}$  de protéine, est calculée comme suit :

$$\text{Teneur en groupements thiols libres } (\mu\text{mol/g}) = \frac{A \times D}{\epsilon \times C}$$

Où :

A: absorbance à 412 nm

D: facteur de dilution

$\epsilon$ : coefficient d'extinction 13600  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

C: concentration du gluten (mg/mL)

## 2.8. Détermination de la structure secondaire par FTIR

La spectroscopie Infrarouge à Transformée Fourier FTIR est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet de détecter des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques et d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (Branger, 2007).

Une analyse spectroscopique FTIR a été effectuée afin d'étudier les changements de structure secondaire du gluten de blé induits par la DIC. Le spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier utilisé est IRAffinity-1S (SHIMADZU, Izasa Scientific, France), équipé par un cristal à simple réflexion totale atténuée (ATR) et un détecteur Mercure-Cadmium-Telluride (MCT). Une faible quantité de l'échantillon en poudre du gluten non traité et traité par la DIC, est déposée sur la surface de cristal ATR à température ambiante et la prise de spectre est obtenue en quelques minutes. Les spectres comptent 32 scans acquis avec une résolution de 8  $\text{cm}^{-1}$  recueillant des données entre 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ . La mesure a été répétée cinq fois pour avoir le spectre moyen de chaque échantillon. Après chaque mesure, le cristal de diamant du spectromètre est nettoyé soigneusement par l'éthanol 70% et l'eau distillée. La détermination de la structure secondaire des protéines du gluten repose sur la déconvolution de la bande d'absorption de l'amide I (1700 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) qui a été faite à l'aide du logiciel Origin (Version 8.0724 PRO, OriginLab Corporation, USA) et le logiciel PeakFit (Version 4.6, USA). Les spectres FTIR sont d'abord collectés et normalisés par la correction



de la ligne de base en utilisant le logiciel LabSolutions IR. Ensuite, la dérivée seconde de la bande de l'amide I est calculée afin d'identifier les structures secondaires qui correspondent aux pics négatifs. La déconvolution est considérée bonne lorsque le coefficient de corrélation  $R^2$  entre la courbe expérimentale et la courbe théorique est supérieur à 0,995. Enfin, la proportion de chaque structure secondaire, exprimée en pourcentage, est obtenue par l'intégration de la surface de la région ajustée de chaque pic (Sivam *et al.*, 2012).

## 2.9. Détermination des propriétés fonctionnelles

### 2.9.1. Détermination de la solubilité

La propriété de solubilité des protéines des glutens, non traité et traités par la DIC, est déterminée selon la méthode de Casella & Whitaker (1990) légèrement modifiée. La solubilité est mesurée à une concentration de 1% (p/v) à pH 3. Les protéines du gluten sont d'abord solubilisées dans l'eau distillée dans un bécher de 50 mL pendant 5 min puis le pH de chaque solution est ajusté à 3 par une solution de HCl 0,5 M. Les solutions sont agitées pendant 1h à température ambiante puis centrifugées à 1640 g pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant est filtré par papier Whatman N°1 pour obtenir un filtrat clair. La quantité des protéines solubles dans le filtrat est déterminée selon la méthode de Lowry *et al* (1951) par le sérum d'albumine bovine comme standard (Yalcin *et al.*, 2008).

La solubilité (S) est calculée selon la formule suivante (Akkouche *et al.* , 2012) :

$$S(\%) = \frac{C}{C_0} \times 100$$

Où :

C: concentration en protéines des glutens traités par la DIC

C<sub>0</sub>: concentration en protéines du gluten non traité

### 2.9.2. Détermination de la capacité émulsifiante

La capacité émulsifiante (EC) du gluten non traité et glutens traités par la DIC est déterminée par la méthode de Yasumatsu *et al.* (1972) (Yalcin *et al.* , 2008). Elle est mesurée à une concentration de 1 % (p/v) à pH 3. Les solutions protéiques sont préparées comme précédemment indiqué dans la détermination de la solubilité. Un volume de 5 mL de la solution de protéique de chaque échantillon est homogénéisé avec 5 mL de l'huile de maïs par l'UltraTurax (IKA model T18D digital, USA) à 23500 tr pendant 90 s pour former une

émulsion. Cette dernière est centrifugée à 3630 g pendant 25 min. La capacité émulsifiante (CE) est calculée selon la formule suivante :

$$CE(\%) = \frac{H_1}{H_T} \times 100$$

Avec :

$H_1$  : hauteur de la couche de l'émulsion dans le tube de la centrifugeuse (mm)

$H_T$  : hauteur de liquide total (mm)

### 2.9.3. Détermination de la capacité moussante

Les propriétés moussantes sont déterminées selon la méthode de Caessens *et al.* (1999). Les solutions protéiques à 1 % (p/v), pH 3, sont préparées comme mentionnées précédemment. Un volume de 10 mL de chaque solution protéique est placé dans un bécher et homogénéisé par Ultraturax (IKA model T18D digital, USA) à 1000 tr pendant 2 min. La capacité moussante (CM) est calculée selon la formule suivante :

$$CM(\%) = \frac{(V - V_0)}{V_0} \times 100$$

Où :

V : volume après homogénéisation (mL)

$V_0$  : volume initial de la solution protéique (mL)

### 2.10. Evaluation de l'immunoréactivité par ELISA Indirect

L'immunoréactivité des glutens, non traité et traités par la DIC, a été mesurée par ELISA indirect pour quantifier les anticorps d'isotype IgA antigliadine. Cette technique est basée sur la détection de complexes Antigène-Anticorps (Ag-Ac) à l'aide d'un marqueur. Brièvement, l'antigène fixé à la surface de puits de microplaques se combine avec l'anticorps ajouté en donnant le complexe Ag-Ac. Ce dernier est détecté ensuite par des anticorps anti-espèces couplés à une enzyme dirigés contre les premiers anticorps. Enfin, le substrat de l'enzyme est ajouté et transformé en produit, ce qui conduit au changement de couleur (Diop et Kaeckenbeek, 1994).

Les gliadines ont été tout d'abord extraites à partir du gluten. Une quantité de 50 mg de la poudre du gluten a été solubilisée dans 4 mL d'éthanol à 70% pendant 1h sous agitation

magnétique à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 g pendant 10 min à température ambiante. Le surnageant récupéré est finalement lyophilisé. Les gliadines extraites sont solubilisées dans le tampon carbonate 0,1 M, pH 9,6 à une concentration de 5 µg/mL. 100 µL des gliadines, natives ou traitées, sont déposées dans chaque puits et les microplaques sont incubées pendant 3h à 30°C. Après trois lavages successifs par tampon phosphate salin tween (PBST) (15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,15 M NaCl; pH 7,4; contenant 0,2% Tween 20 (v/v)), les microplaques sont bloquées par une solution de BSA (sérum d'albumine bovine) à 1% dans PBST pendant 2 h. Après trois lavages respectifs, les sérums sanguins individuels des trois malades cœliaques dilués à 1/201 dans PBST contenant 0,1% de gélatine sont incubés à température ambiante. Après 30 min d'incubation, les microplaques sont lavées trois fois et incubées avec l'anticorps secondaire Anti-Human IgA couplé à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase HRP), 100 µL dans chaque puits, dilué dans PBSTG à 1:2000. Après trois lavages successifs, l'activité est développée par Chromogène / substrat à l'obscurité. Après 30 min d'incubation, la réaction est arrêtée par l'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M et l'absorbance est mesurée par un lecteur de microplaques à 450 nm (TECAN, infinite F50, Switzerland) (Cabrera-Chávez *et al.*, 2008; Cabrera-Chávez *et al.*, 2010). L'immunoréactivité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Immunoréactivité (\%)} = \frac{\text{Absorbance de gliadine extraite du gluten traité par DIC}}{\text{Absorbance de gliadine extraite du gluten non traité}} \times 100$$

### **2.11. Digestion enzymatique et évaluation de l'immunoreactivité par ELISA R5 compétitif**

ELISA R 5 compétitif a pour but la quantification des épitopes potentiellement toxiques en utilisant le Kit RIDASCREEN® Gliadin competitive (RIDASCREEN® Gliadin competitive, R-Biopharm AG Darmstadt, Allemagne). Ce test repose sur la compétition entre la gliadine adsorbée sur les parois d'un puits et la gliadine libre à doser pour la fixation avec l'anticorps monoclonal R5. Ce dernier est capable de reconnaître les épitopes immunostimulants, riches en proline et glutamine, répétés dans les molécules de prolamines notamment QQFPF, QQQFP, PQFPF, LQFPF, QQPYP, QLPYP contenus dans les peptides potentiellement toxiques comme 33-mer, 26-mer et 25-mer dans un produit hydrolysé (Mena et Sousa, 2015).

Les échantillons du gluten et de pains, témoins et traités par la DIC, sont d'abord digérés avant d'être analysés par le test ELISA. Ils sont dispersés dans l'eau distillée selon un rapport

de 5% (p/v) pour la poudre du gluten et 10% (p/v) pour les pains et le pH est ajusté à 1,8 par une solution de HCl 1 M. Ensuite, 2,5 mg de pepsine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Italie) sont ajoutés pour réagir pendant 4 h sous agitation à 37°C. Puis, le pH est ajusté à 7,8 par une solution de NaOH 1M et 2,5 mg de la trypsine (Gibco, Life Technology, Royaume Uni) sont ajoutés au mélange pour réagir pendant 4 h sous agitation à 37°C. Finalement, le pH est ajusté à pH 4,5 avec une solution de HCl 1M et l'hydrolysate peptique-trypsique est centrifugé à 4000 g pendant 20 min à température ambiante. Le surnageant est alors congelé et lyophilisé. Les résidus lyophilisés obtenus sont solubilisés dans 10 mL d'une solution d'éthanol 60% pendant 30 secondes par vortex. Ensuite, ils sont bien agités manuellement pendant 10 min puis centrifugés à 2500 g pendant 10 min à température ambiante. Après dilution du surnageant à 1/50000, 50 µL de chaque solution étalon (mélange d'hydrolysats de blé, de seigle et de l'orge) ou de chaque solution des échantillons sont déposés dans les puits. 50 µL de l'anticorps monoclonal R5 anti-gliadine couplé à la peroxydase sont ajoutés à chaque puits et incubé pendant 30 min à température ambiante. Trois lavages successifs ont été effectués par l'ajout de 250 µL de tampon de lavage dilué par puits pour éliminer l'enzyme conjuguée non liée. 100 µL de substrat chromogène sont ajoutés à chaque puits pour la révélation de la réaction Ag-Ac. Après incubation à l'obscurité pendant 10 min, 100 µL de la solution stop sont ajoutés à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. Après 10 min, l'absorbance est mesurée à 450 nm par le lecteur de microplaque (Multiskan EX Labsystems, États-Unis). La quantité des épitopes obtenues est déduite à partir de la courbe d'étalonnage (Figure 15) réalisée selon les instructions du kit. Elle est exprimée en mg du gluten / kg de produit ou ppm selon la formule suivante :

$$\text{Concentration du gluten (ppm)} = \frac{\left[\left(\frac{1}{A}\right) - b\right] \times D \times V \times 10^3}{a \times 10^6}$$

Avec :

A : absorbance à 450 nm

a : pente de la droite de régression

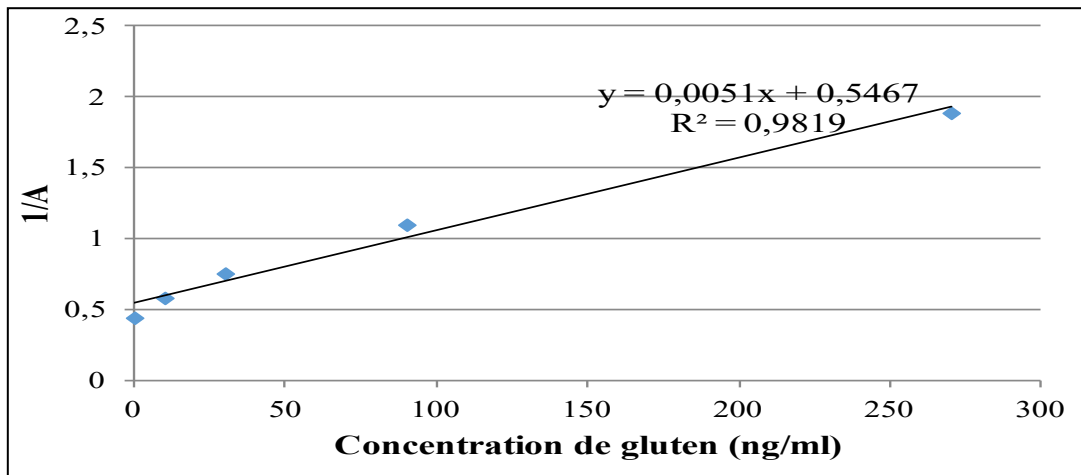
b : ordonnée à l'origine de la droite de régression

D : facteur de dilution (50000)

V : volume de la solution de l'hydrolysate (10 mL)

$10^3$  : coefficient de conversion de mg/g au mg/kg

$10^6$  : coefficient de conversion de ng au g



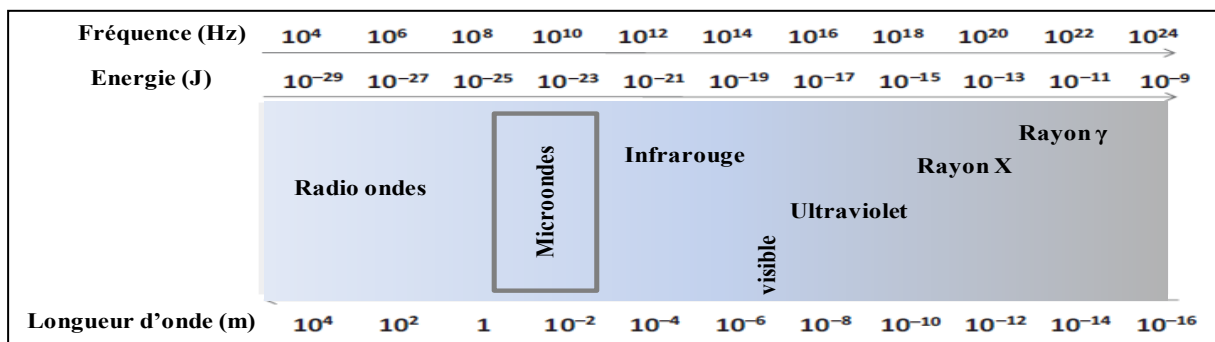
**Figure 15.** Courbe d'étalonnage pour le dosage des épitopes toxiques par ELISA R5 compétitif.

### 3. Etude des effets du traitement Micro-ondes sur les protéines du gluten de blé

#### 3.1. Application du traitement Micro-ondes

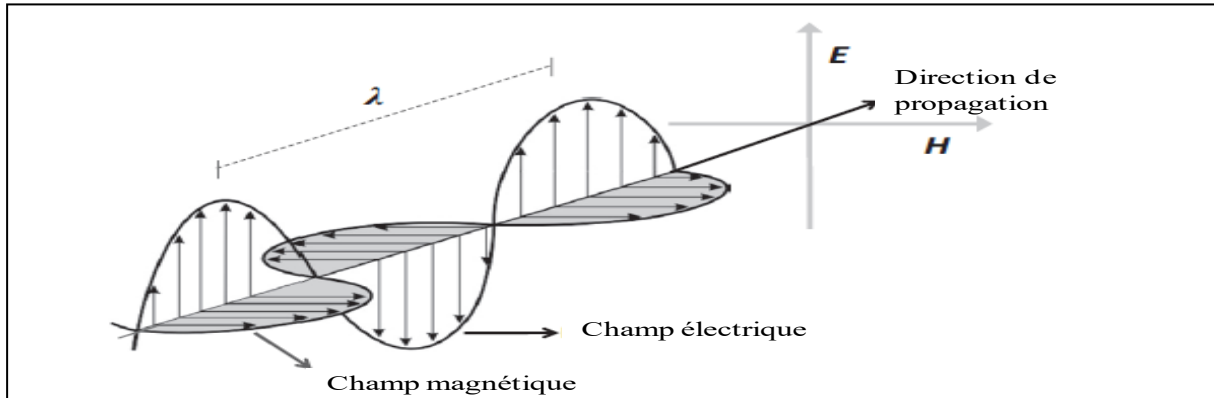
##### 3.1.1. Définition des Micro-ondes

Les Micro-ondes sont des rayonnements électromagnétiques de longueurs d'ondes comprises entre 1m et 1 mm, ce qui correspond à des fréquences variant entre 300 MHz et 300 GHz (Figure 16) (Mello *et al.*, 2014).



**Figure 16.** Quelques régions de spectre électromagnétique (Mello *et al.*, 2014).

Les ondes électromagnétiques sont constituées d'un champ magnétique et d'un champ électrique perpendiculaire (Figure 17). Elles sont situées entre ondes radio à une fréquence plus faible et l'infrarouge et la lumière visible à une fréquence plus élevée.



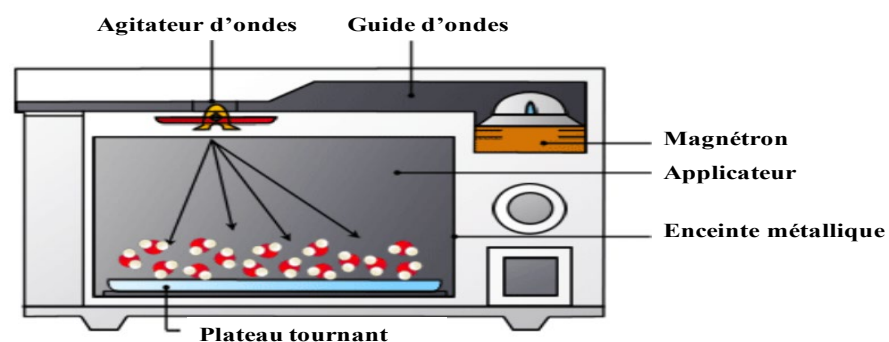
**Figure 17.** Représentation schématique d'une onde électromagnétique (Mello *et al.*, 2014).

$\lambda$  : longueur d'onde, E : champ électrique, H : champ magnétique

### 3.1.2. Appareillage

L'appareil de Micro-ondes utilisé dans cette étude est un four à Micro-ondes domestique de la marque Condor. Ses caractéristiques sont mentionnées dans l'annexe 3. La figure 18 illustre les principaux éléments de four à Micro-ondes qui sont :

- **Magnétron ou générateur** est la pièce centrale et principale du four à Micro-ondes. Il a pour fonction la transformation de l'énergie électrique en énergie électromagnétique sous forme de Micro-ondes de longueur d'onde de 12 cm et une fréquence de 2450 MHz (Datta, 2001).
- **Guide d'ondes** est un tuyau métallique qui conduit les ondes depuis le magnétron jusqu'à l'applicateur (Kingston et Haswell, 1997).
- **Applicateur** est une cavité fermée hermétiquement qui assure le transfert de l'énergie électromagnétique depuis la sortie du guide jusqu'au produit à traiter (Datta, 2001).



**Figure 18.** Schéma d'un four à Micro-ondes domestique.

### 3.1.3. Fonctionnement du four à Micro-ondes

Le four à Micro-ondes consiste à convertir l'énergie électrique en champ électromagnétique par le magnétron. Lorsque ce champ traverse l'aliment, le champ électrique interagit avec seulement les ions et les molécules polaires, particulièrement les molécules de l'eau, qui tournent à la même fréquence du champ. Ce mouvement provoque l'échauffement de l'aliment (Panneton *et al.*, 2000).

### 3.1.4. Conditions de l'application de traitement Micro-ondes

Les échantillons du gluten ont été traités par Micro-ondes selon un plan d'expérience CCD à deux facteurs, puissance (W) et temps de traitement (s), et à cinq niveaux (- $\alpha$ , -1, 0, +1, + $\alpha$ ) (Tableau 10). Une quantité de 33 g de la poudre du gluten a été mise dans récipient en verre et introduite dans le four à Micro-ondes. La série des variables a été sélectionnée sur la base des tests préliminaires effectués. Les valeurs minimales permettent de chauffer le gluten tandis que les valeurs maximales le chauffent en évitant de le brûler. La matrice du plan CCD est établie par le logiciel statistique Minitab (Version 13.31, Inc, PA 16801, USA) (Tableau 11).

**Tableau 10.** Niveaux expérimentaux des deux variables indépendantes du plan expérimental composite centré du traitement Micro-ondes.

Variables indépendantes	Symboles mathématiques	Valeurs codées et réelles				
		-1,414	-1	0	+1	+1,414
Puissance (W)	X <sub>1</sub>	200	317,1	600	882,8	1000
Temps (s)	X <sub>2</sub>	20	25,85	40	54,14	60

**Tableau 11.** Matrice du plan expérimental composite centré du traitement Micro-ondes.

Essai	Codes		Puissance (W) (X <sub>1</sub> )	Temps (s) (X <sub>2</sub> )
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>		
1	-1	-1	317,1	25,85
2	+1	-1	882,8	25,85
3	-1	+1	317,1	54,14
4	+1	+1	882,8	54,14
5	-1,414	0	200	40
6	+1,414	0	1000	40
7	0	-1,414	600	20
8	0	+1,414	600	60
9	0	0	600	40
10	0	0	600	40
11	0	0	600	40
12	0	0	600	40
13	0	0	600	40

### 3.2. Mesure de la température du gluten après traitement Micro-ondes

La température des échantillons du gluten a été mesurée par un thermomètre électronique (WT1) juste après le traitement Micro-ondes.

### 3.3. Mesure de la teneur en eau après traitement Micro-ondes

La teneur en eau des échantillons, gluten témoin et glutens traités par Micro-ondes, a été déterminée selon la méthode AACC 44-19 (AACC, 2000). L'échantillon est séché dans une étuve à air chaud (Mettler, UM 200, Allemagne) à 135°C pendant 2h jusqu'à poids constant. La teneur en eau est donnée par la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{(P_0 - P_1)}{P_0} \times 100$$

Où :

H% : teneur en eau (%)

P<sub>0</sub> : poids initial de l'échantillon (g)

P<sub>1</sub> : poids sec de l'échantillon (g)



### 3.4. Séparation des protéines du gluten par SDS-PAGE

Les gliadines et les gluténines sont extraites à partir du gluten, témoin et traités par Micro-ondes, ensuite chaque fraction est séparée par SDS PAGE (Singh *et al.*, 1991 ) pour mieux voir les changements induits par le traitement Micro-ondes. Les gliadines sont extraites par propanol aqueux 50% (v/v), séchées à 65°C pendant toute la nuit et ré-solubilisées dans le tampon de l'échantillon. Le culot contenant des traces des gliadines est lavé deux fois par la solution de 1-propanol 50% (v/v) pour éliminer complètement les gliadines. Puis, les gluténines sont réduites et alkylées dans une solution de 1-propanol 50% (v/v) avec DTT 1% (p/v) et 4- vinylpyridine 1,4% (p/v) respectivement. Après centrifugation, le tampon d'échantillon est ajouté au surnageant (1:1) (Annexes 4 et 5). Les fractions des gliadines et des gluténines sont séparées dans les gels de séparation de 10,3% (Annexe 6a ) et 12,5% (Annexe 6b ) respectivement, dans un système vertical d'électrophorèse (Hoefer, SE600, San Francisco, CA, USA). Les gels obtenus ont été scannés par un scanner à plat (Umax PowerLook 1100, Fremont, CA, USA)

### 3.5. Quantification des protéines du gluten par HPLC-RP

Les gliadines et les gluténines sont séparées selon leur hydrophobicité par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase inversée HPLC-RP suivant la méthode de Wieser *et al.* (1998), après avoir été extraites selon la méthode décrite par Singh *et al.* (1991). Brièvement, les gliadines sont solubilisées dans du 1-propanol aqueux à 50% et les gluténines présentes dans le culot sont solubilisées dans du 1-propanol aqueux à 50% contenant DTT 1% (p/v) et l'iodoacétamide 2,5% (p/v). Pour l'analyse HPLC, la colonne utilisée est de type RP-C8 (Macherey-Nagel, Allemagne, 25 cm x 4,5 mm id. 5 µm) maintenue à 50 ° C pendant le processus de séparation et des volumes d'injection de 50 µL pour les gluténines et de 100 µL pour les gliadines ont été utilisés. Une élution en gradient a été réalisée; éluant A constitué d'acide trifluoroacétique aqueux à 0,1% (v / v) et éluant B constitué d'acétonitrile et d'acide trifluoroacétique (99,9 / 0,1, v / v), avec le programme d'élution suivant: 0 min 28% A, 30 min 56% B, débit de 1 mL/min. La détection a été effectuée par absorbance en ultraviolet (UV) à 210 nm. Après chaque analyse, la colonne a été nettoyée en utilisant 90% de l'éluant A pendant 5 min et équilibrée à 28% de B pendant 10 min. Le développement d'une courbe standard pour la procédure quantitative de HPLC-RP a été effectuée en utilisant des concentrations croissantes de BSA (Ribeiro *et al.*, 2016).

### 3.6. Détermination des propriétés rhéologiques

Les tests de microextension sur les glutens traités par Micro-ondes pour mesurer l'extensibilité (Ext) et la résistance maximale à l'extension (Rmax) ont été réalisés par un analyseur de Texture TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, Royaume Uni) selon la méthode de Kieffer *et al.* (2007) décrite précédemment .

### 3.7. Détermination de la teneur en groupements thiols libres

La teneur en groupements thiol libres est déterminée selon la méthode de Chan et Wasserman (1993) légèrement modifiée. Une quantité de 10 mg des échantillons du gluten est solubilisée dans 1 mL de tampon A contenant 8 M de l'urée, 3 mM EDTA, 1% de SDS (p/v), et 0,2 M de Tris-HCl, pH 8. Les échantillons sont homogénéisés par vortex pendant 30 secondes et agités sur une plaque agitatrices pendant 1h a température ambiante. Un volume de 0,1 mL du tampon B contenant 10 mM de DTNB dans 0,2 M Tris-HCl, pH 8 est ajouté à chaque échantillon et agité pendant 1h. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13600 g pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance du surnageant est lue à 412 nm par spectrophotomètre (LLG-uniSPEC 2, France) contre un blanc contenant 1 mL de Tampon A et 0,1 mL de tampon B (Tuhumur *et al.*, 2014). La concentration en groupements thiols libres exprimée en  $\mu\text{mol/g}$  de protéine est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en groupements thiols libres } (\mu\text{mol/g}) = \frac{A \times D}{\epsilon \times C}$$

Où :

A: absorbance à 412 nm;

D: facteur de dilution;

$\epsilon$ : coefficient d'extinction  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;

C: concentration du gluten (mg/mL).

### 3.8. Détermination de la structure secondaire par FTIR

Pour étudier les changements de structure secondaire du gluten traité par Micro-ondes, la spectroscopie Infrarouge à Transformée Fourier (FTIR) est utilisée. Les spectres FTIR comptent 128 scans acquis avec une résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$  recueillant des données entre  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  par le spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier IRAffinity-1S (SHIMADZU, Izasa Scientific, France) équipé par un cristal à simple réflexion totale

atténuée (ATR) et détecteur Mercure-Cadmium-Telluride (MCT). Le traitement des résultats a été fait comme mentionné précédemment (Sivam *et al.*, 2012).

### 3.9. Séparation des protéines du gluten par AFFFF

Le fractionnement par flux de force asymétrique, en anglais *Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation (AFFFF)*, est une technique qui permet la séparation des molécules selon leurs tailles sous l'effet de l'écoulement d'un flux laminaire dans un canal asymétrique sur lequel un champ de force perpendiculaire est appliqué.

La séparation par AFFFF passe par trois principales étapes (Figure 19):

#### ✓ *Injection et focalisation*

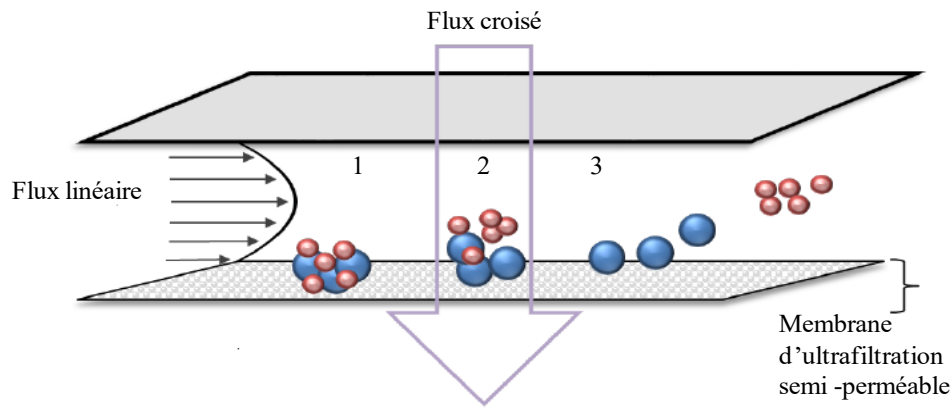
L'échantillon injecté dans le canal par un auto-injecteur se mélange avec le flux linéaire généré par une pompe. Le solvant d'élution utilisé comme phase mobile est le tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 6,9) contenant 0,1% de SDS (p/v), filtré par une membrane de porosité 0,1 mm et dégazé avant d'être pompé dans le canal. Ensuite, les molécules de l'échantillon se focalisent sous forme d'une petite bande sur la membrane semi-perméable.

#### ✓ *Relaxation*

Au cours de cette étape, un champ de force perpendiculaire est appliqué afin de créer un gradient de concentration induisant le transport des molécules en fonction de leurs caractéristiques intrinsèques vers la paroi de l'accumulation.

#### ✓ *Elution*

Lors de la dernière étape, le champ de force perpendiculaire est arrêté et les molécules sont éluées sous l'effet de flux linéaire selon leurs tailles. Les petites molécules ayant un coefficient de diffusion élevé se déplacent plus rapidement que les grandes. En conséquence, les petites molécules sont éluées les premières. À la fin, toutes les molécules fractionnées sont analysées par un détecteur Ultra-Violet (UV), un détecteur de Diffusion dynamique de la lumière (MALS) et un détecteur d'indice de réfraction différentiel.



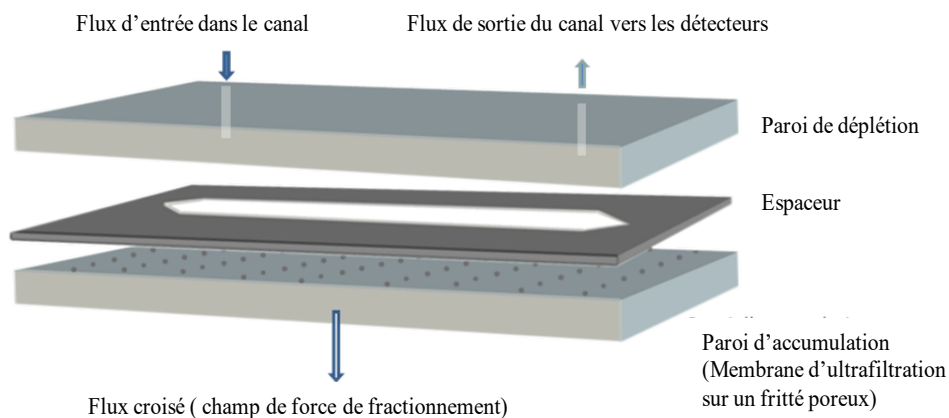
**Figure 19.** Étapes de la séparation des molécules par Fractionnement par Flux de Force Asymétrique (Wahlund *et al.*, 1996).

1-Injection et focalisation, 2-Relaxation, 3-Elution

Les échantillons sont préparés et analysés par Fractionnement par Flux de Force Asymétrique (AFFF) selon le protocole d'extraction des protéines de Lemelin *et al.* (2005) et Gozé *et al.* (2017). Dans un premier temps, 30 mg de la poudre du gluten sont dispersés dans 1 mL de tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 6,9, contenant 2% de SDS (p/v). Après 15 min d'incubation à 60°C sous agitation constante, les gliadines et une partie des gluténines sont extraites. Les échantillons sont ensuite soniqués pendant 20 s à 3W à l'aide d'une sonde de 3 mm de diamètre (Sonics Materials, Bioblock Scientific, model 75038) afin d'extraire le reste des gluténines. Les extraits sont ensuite centrifugés à 12500 g pendant 15 min à 20°C. Les surnageant recueillis, contenant les protéines totales, sont ensuite filtrés sur un papier filtre de 0,45µm avant d'être injectés (30 µL) dans le système AFFF/MALS.

La cellule AFFF utilisée est de type Eclipse 3 F (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) (Figure 20). Elle est connectée à un détecteur Ultraviolet (Agilent 1200, Agilent Technologies, Allemagne), un détecteur MALS (Multi-angle Dawn Heleos TM, Wyatt Technology Corporation, Europe) et un réfractomètre interférométrique (Optilab rEX, Wyatt Technology Corporation, Europe). Cette cellule est composée de deux plaques séparées par un film espaceur de 350 µm d'épaisseur. La plaque supérieure est imperméable alors que la plaque inférieure est perméable et recouverte par une membrane en cellulose d'ultrafiltration et, une paroi d'accumulation, avec un seuil de coupure de 10 kDa (LC-10 Nadir reg. Cell, Wyatt Technology Europe Allemagne) pour empêcher la sortie des molécules du canal et permettre le passage du liquide. La teneur en protéines est déterminée pour chaque extrait par

la méthode de combustion de Dumas. L'absorbance a été mesurée à 214 nm. Le canal a une géométrie trapézoïdale et une longueur de 286 mm. Une pompe HPLC isocratique Agilent série 1200 (Agilent Technologies, Allemagne) avec un dégazeur à vide en ligne livre le flux porteur vers le canal. Un filtre en ligne de 0,45  $\mu\text{m}$  (Gelman Sciences, France) a été installé entre la pompe principale et l'Eclipse système. Un tampon phosphate de sodium (0,05 M, pH 6,9) contenant 0,1% de SDS (p/v), filtré à travers une membrane de 0,1 mm (Gelman Sciences, France), a été utilisé comme phase mobile. Pour les fractionnements, un gradient dans le flux transversal a été utilisé. Le temps de mise au point était de 0,5 min à un débit de 2 mL / min, suivi d'un temps de mise au point / injection de 1,0 min à 0,2 mL / min et un temps de relaxation / focalisation de 0,5 min. L'élution a ensuite suivi un débit sortant de 1,0 mL / min et avec un débit transversal décroissant exponentiellement de 3,0 à 0,0 mL / min pendant 14 min. Finalement, l'élution à un débit transversal de 0,0 mL / min a été maintenue pendant 9 min.



**Figure 20.** Cellule de Fractionnement par Flux de Force Asymétrique.

Les principaux paramètres obtenus après fractionnement des protéines sont :

- $M_n$  : Rapport de la masse de l'échantillon sur le nombre de chaînes.
- $M_w$  : Masse molaire moyenne en poids.
- $I_p$  : Indice de polymolécularité (Polydispersité)

C'est le rapport  $M_w/M_n$   $\left\{ \begin{array}{l} I_p = 1 : \text{Monodisperse} \\ I_p > 1 : \text{Polydisperse} \end{array} \right.$

### 3.10. Détermination de l'extractibilité des protéines du gluten par SCE

Les protéines du gluten témoin et des glutens traités par Micro-ondes sont extraites selon la procédure d'extraction séquentielle de dodécylsulfate de sodium SDS (Carceller et Aussenac, 1999; Gupta *et al.*, 1993).

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une chromatographie en phase liquide à haute vitesse afin de séparer les molécules selon leurs tailles. Elle consiste à éluer une solution contenant des molécules de différentes masses dans une colonne remplie par un matériau ayant une structure poreuse ; c'est la phase stationnaire. L'ordre d'élution de ces molécules en fonction de leur taille est décroissant (les grosses molécules seront éluées avant les petites molécules) (Thierry *et al.*, 2014).

La protéine totale polymérique est séparée en deux fractions selon leur extractibilité dans SDS-Tampon phosphate 2% (p/v), sans sonication, avec les fractions extractibles (F1s+F2s) et non-extractibles (F1i+F2i). Brièvement, les échantillons (0,01g) sont suspendus dans 1 mL de tampon phosphate sodium 0,05 M, pH 6,9 contenant 2% de SDS (p/v) et agités pendant 2 h à 60°C. Ces extractions sont ensuite suivies par une centrifugation à 12500 g pendant 30 min à 20°C pour obtenir un surnageant contenant la protéine polymérique extractible (F1s+F2s) EPP. La protéine polymérique non extractible (F1i+F2i) UPP est soniquée pendant 20 s à une puissance de 30% (25 W, 23kHz) dans 1 mL de 2% SDS-tampon phosphate sodium (pH 6,9) en utilisant une micropointe étagée de 3 mm de diamètre pour solubiliser la protéine restante (protéines non extractibles). Les deux extraits sont filtrés par des membranes de filtration en cellulose régénérées de 0,45 µm (Gelman Sciences, France) et 25 µL sont ensuite injectés sur une colonne analytique d'exclusion de taille TSKgel G4000 SW (7,5×300 mm, 8 µm) (TOSOHAAS, Stuttgart, Allemagne). L'appareil d'HPLC est Agilent 1200 (Agilent Technologies, Allemagne) composé d'un dégazeur en ligne, une pompe isocratique, un auto-injecteur et un détecteur de longueurs d'ondes (réglé à 214 nm). Le tampon phosphate sodium (0,1M, pH 6,9) contenant 0,1% de SDS (p/v) est utilisé comme éluant avec un débit de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Pendant le fractionnement, la colonne est maintenue à 25°C. Pour la fraction extractible, le profil d'élution est divisé en quatre principaux pics correspondant aux gluténines polymériques (F1s+F2s), gliadines (F3) et protéines fonctionnelles (F4).

Le pourcentage de protéine polymérique non extractible dans les protéines polymériques totales est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{UPP}{TPP} (\%) = \frac{\text{surfaces (F1i + F2i) (non extractible)}}{\text{surfaces (F1s + F2s)(extractible) + surfaces (F1i + F2i) (non extractible)}} \times 100$$

Le ratio de la protéine polymérique non extractible par rapport à la protéine polymérique extractible est le suivant :

$$\frac{UPP}{EPP} = \frac{\text{surfaces (F1i + F2i) (non extractible)}}{\text{surfaces (F1s + F2s) (extractible)}}$$

Le ratio protéine de gliadine non extractible (Glii) par rapport à la protéine de gliadine extractible (Glis) est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{Glii}{Glis} = \frac{\text{surface F3i (non extractible)}}{\text{surface F3s (extractible)}}$$

### **3.11. Digestion enzymatique et évaluation de l'immunoreactivité par ELISA R5 compétitif**

La quantification des épitopes potentiellement toxiques des glutens traités par Micro-ondes a été faite par ELISA R5 compétitif en utilisant le Kit RIDASCREEN® Gliadin competitive (RIDASCREEN® Gliadin competitive, R-Biopharm AG Darmstadt, Allemagne). Les échantillons ont été d'abord hydrolysés par les enzymes digestives, pepsine et trypsine. Après lyophilisation et solubilisation dans l'éthanol, les échantillons sont analysés selon les instructions précédemment décrites. La quantité des épitopes obtenue est déduite à partir de la courbe d'étalonnage.

## **4. Analyse statistique**

Les essais ont été répétés globalement trois fois à l'exception du test ELISA et l'humidité des échantillons après traitement MO, deux fois, et le FTIR, cinq fois. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type. La différence entre les différentes moyennes a été déterminée par l'analyse de la variance à un facteur de classification (ANOVA) à l'aide du logiciel Minitab (Version 13.31, Inc, PA 16801, USA). Les comparaisons multiples ont été réalisées selon la méthode progressive en deux étapes de Benjamini *et al.* (2006) à l'aide du logiciel GraphPad Prism (Version 7, Inc., USA). Un test de corrélation a été également effectué. La signification statistique a été acceptée à un niveau de  $p < 0,05$ . Les surfaces de réponses ont été faites en utilisant le logiciel STATISTICA (Version 10; Tulsa, Oklahoma, USA).

# *Résultats et discussion*



## **1. Caractéristiques de la farine de blé tendre**

### **1.1. Caractéristiques physicochimiques**

#### **1.1.1. Teneur en eau**

La quantité de l'eau contenue dans les farines joue un rôle important dans la détermination de leur qualité. La teneur en eau optimale des farines qui permet une bonne conservation doit être comprise entre 10 et 16% (Grandvoinnent et Pratz, 1994 ; Chene, 2001). Au delà de 16%, plusieurs réactions chimiques (Oxydation des lipides, réaction de Maillard) et enzymatique (hydrolyse des lipides, des protéines et des glucides) peuvent se déclencher. De plus, l'excès en eau provoque le développement des bactéries, des levures, des moisissures et des insectes (Alais *et al.*, 2008). La teneur en eau de la farine utilisée dans cette étude est dans les normes, elle est de  $12,44 \pm 0,05\%$ . La détermination de la teneur en eau est aussi indispensable, de point de vue analytique, pour fixer la quantité de l'eau à ajouter aux farines pour réaliser les tests de rhéologie et de panification (Feillet, 2000).

#### **1.1.2. Teneur en matière grasse libre**

La matière grasse des farines de blé est composée principalement de 50% des glycérides (mono, di et triglycérides), 24 à 28% des glycolipides, 20 à 25% des phospholipides et environ 5% des acides gras libres (Feillet, 2000). Le résultat obtenu après dosage des lipides révèle une teneur égale à  $1,26 \pm 0,37\%$  par rapport à la matière sèche. Ce résultat concorde avec celui établi par Atwell (2001) qui rapporte une teneur en lipides pour la farine de blé tendre variant entre 1 et 2%. En dépit de la faible teneur des lipides, leur rôle est primordial dans la détermination des propriétés rhéologiques de la pâte et des propriétés technologiques et organoleptiques du pain (Goesaert *et al.*, 2005; Feillet, 2000).

#### **1.1.3. Teneur en protéines totales**

Les protéines de la farine de blé tendre sont classées selon leur solubilité et leur fonction en deux groupes : les protéines de réserve, gliadines et gluténines, et les protéines fonctionnelles, albumines et globulines (Shewry, 2003). La teneur en protéines totales ainsi que la proportion de chaque groupe de protéines, notamment les protéines de réserve, ont un effet significatif sur les propriétés rhéologiques de la pâte et la qualité technologique du pain. Le rapport gluténines / gliadines est lié avec la force boulangère des farines. Le rapport optimal varie de 1 à 1,2. D'après le résultat obtenu, la teneur en protéines totales de la farine est de  $10,62 \pm 0,4\%$  par rapport à la matière sèche, ce résultat est conforme aux teneurs rapportées par

Atwell (2001), qui sont comprises entre 7 et 14%. La teneur en protéines des farines est corrélée positivement avec la qualité du pain (Marinciu et Săulescu, 2008). Elle varie en fonction de la variété de blé, les conditions de culture et le stade de maturité des graines (Joubrane et Machlab, 2003).

#### 1.1.4. Teneur en cendres

La mesure de la teneur en cendre permet de déterminer non seulement le taux d'extraction mais aussi le degré de pureté des farines afin de les classer et les destiner à la fabrication de différents produits céréaliers (Feillet, 2000). La farine de blé tendre utilisée dans cette étude contient  $0,63 \pm 0,051\%$  de cendres par rapport à la matière sèche. Cette teneur se situe bien dans l'intervalle donné par Boudreau et Menard (1992) qui indiquent que les teneurs en cendres des farines panifiables ne doivent pas dépasser 0,6%. La teneur en cendres des farines dépend essentiellement de deux facteurs qui sont la richesse du sol en éléments nutritifs et la variété du blé. En outre, la valeur nutritionnelle des farines est corrélée positivement avec la teneur en cendres (Feillet, 2000).

## 1.2. Caractéristiques rhéologiques

Les caractéristiques rhéologiques de la pâte à base de la farine de blé tendre mesurées par l'Alvéographe Chopin ainsi que les normes algériennes et françaises de panification sont mentionnées dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Caractéristiques rhéologiques de la farine de blé tendre étudiée.

Paramètres	W ( $10^{-4}$ ) J	G ( $\text{cm}^3$ )	P/L
<b>Farine de blé tendre</b>	194,33±8,38	20,23± 0,87	0,87±0,11
<b>Normes algériennes de panification</b>	[130 à 180]	>20	[0,45 à 0,65]
<b>Normes françaises de panification</b>	[200 à 220]	[20 à 24]	[0,5 à 0,7]

G : gonflement, P/L : rapport de configuration (élasticité/ extensibilité), W : travail de déformation.

Cette mesure fournit des informations importantes aux meuniers pour identifier le type de farine et préciser le produit céréalier convenable. Une farine avec une valeur P faible (force du gluten) est destinée à la fabrication des biscuits et autres produits de viennoiserie. Alors qu'une farine avec des valeurs P élevées est utilisée en panification (Badje *et al.* , 2019).

### 1.2.1. Travail de déformation

Le paramètre W constitue la mesure la plus intéressante pour estimer la qualité boulangère d'une farine. Le travail de déformation W de la présente farine est de  $(194,33 \pm 8,38) 10^{-4}$  J. Il est supérieur aux valeurs données par les normes algériennes (J.O.R.A. , 1991), à savoir (130 à 180)  $10^{-4}$  J pour les farines panifiables. Cependant, il est légèrement inférieur par rapport à l'intervalle préconisé par Guinet et Godon (1994), à savoir (200 et 220)  $10^{-4}$  J. Cette farine peut être jugée comme une farine panifiable de qualité boulangère moyenne.

### 1.2.2. Indice de gonflement

L'indice de gonflement G renseigne sur l'extensibilité de la pâte. Il permet la mesure de l'aptitude de la pâte à retenir le gaz carbonique (Kitissou, 1995). La valeur de gonflement de cette farine est de  $20,23 \pm 0,87$  cm<sup>3</sup>. Elle est conforme aux normes algériennes (J.O.R.A. , 1991) et françaises de panification (Guinet et Godon, 1994) et à celles rapportées par Roussel et Hubert (2002) qui varient entre 20 et 24 cm<sup>3</sup>.

### 1.2.3. Rapport de configuration

Le rapport de configuration P/L de la courbe ou le rapport de la ténacité au gonflement, représente l'équilibre entre la ténacité et l'extensibilité des pâtes. Le rapport de configuration P/L enregistré pour la farine de blé tendre est de  $0,87 \pm 0,11$ . Comparativement aux normes algériennes (J.O.R.A, 1991) et françaises (Guinet et Godon, 1994), cette valeur est supérieure. Selon Dubreil *et al.*(1998), ce rapport dépend de plusieurs facteurs, parmi lesquels : la teneur en protéines totales, le rapport gluténines / gliadines et leur degré d'agrégation. Selon Delfrate et Stephane (2005), les farines ayant un rapport P/L élevé ( $> 1$ ) donneront des pâtes trop tenaces, peu tolérantes au pétrissage et montrant une tendance à absorber beaucoup d'eau, ainsi qu'un faible gonflement. Alors que pour des P/L faible ( $< 0,3$ ), les pâtes seront trop extensibles et difficiles à manier.

## 2. Caractéristiques physicochimiques du gluten de blé

### 2.1. Teneur en eau

La teneur en eau du gluten est de  $8,33 \pm 0,57\%$ . Cette valeur est proche à celle rapportée par Dacosta (1986) qui est comprises entre 7 et 8%. Selon Godon et Willm (1991), la teneur en eau du gluten doit être inférieure à 10%. Cette teneur est acceptable et permet une bonne conservation pendant une longue période sans risque d'agrégation.

## **2.2. Teneur en matière grasse libre**

La teneur en lipides libres du gluten est de  $5,18 \pm 0,2\%$  par rapport à la matière sèche. Selon Feillet (2000), la teneur en matière grasse du gluten de blé varie de 5 à 8%. Cette valeur est dans les normes.

## **2.3. Teneur en protéines**

La teneur en protéines contenue dans le gluten est de  $69,61 \pm 0,24\%$ . Ce taux est inférieur à celui donné par Dacosta (1986) qui est compris entre 75 et 85%. Selon Wieser (2007), la teneur en protéines totales du gluten dépend des conditions de l'extraction du gluten.

## **2.4. Teneur en cendres**

Le gluten extrait de la farine présente une teneur en cendres de  $1,48 \pm 0,08\%$  par rapport à la matière sèche. Cette valeur est légèrement supérieure à celles données par Dacosta (1986), qui est de 1,2%, et Feillet (2000), qui est de 1%.

## **3. Effets de la DIC sur les protéines du gluten de blé**

Afin d'évaluer les changements induits par la DIC, les échantillons du gluten traités ont été analysés par SDS-PAGE et électrophorèse bidimensionnelle, FTIR, texturomètre et ELISA (indirect et compétitif). Autres analyses ont été effectuées comme le dosage des groupements thiols libres et la mesure de la solubilité des protéines et leur pouvoir moussant et émulsifiant.

### **3.1. Ajustement du modèle**

Les coefficients de régression avec leurs significations observés par ANOVA testant l'effet linéaire, quadratique et interaction des deux facteurs, température ( $X_1$ ) et temps de traitement ( $X_2$ ), sont présentés dans le tableau 13. L'adéquation du modèle est indiquée par un coefficient de détermination satisfaisant ( $R^2 > 70\%$ ) (Granato et de Araújo Calado, 2014). Néanmoins, la signification du modèle pour la l'immunoréactivité des trois malades cœliaques n'a pas été prise en considération à cause de la variabilité de leurs réponses vis-à-vis les glutens traités par la DIC.

**Tableau 13.** Coefficients de régression pour les surfaces de réponse des glutens de blé traités par la DIC.

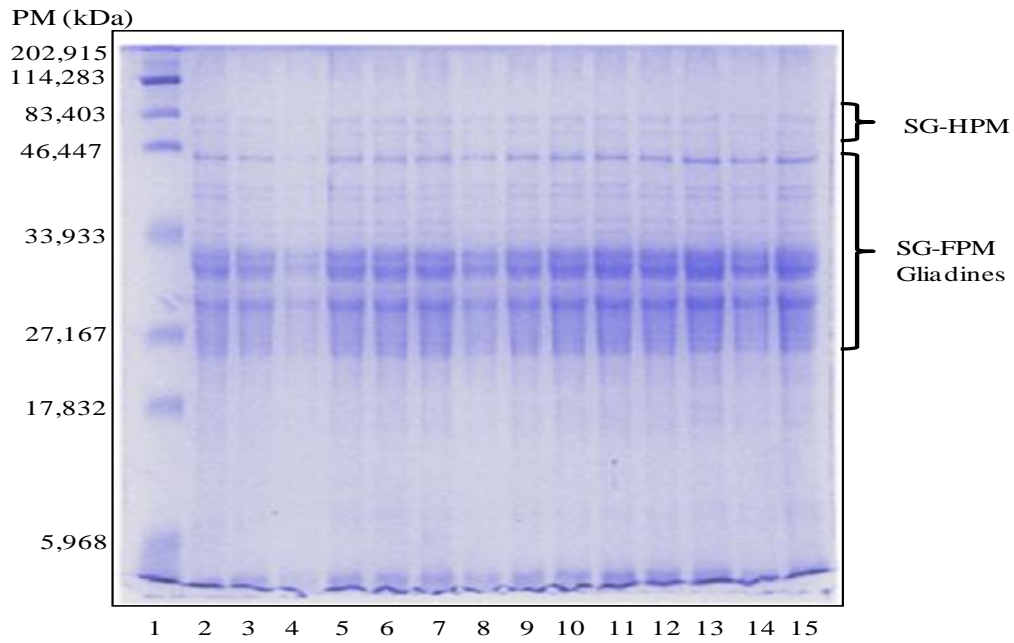
	Groupements thiols libres	Solubilité (%)	Capacité émulsifiante (%)	Capacité moussante (%)
<b>Constante</b>	5,484*	77,18*	74,333*	1,02*
<b>X<sub>1</sub> (β<sub>1</sub>)</b>	0,2030*	-4,33 <sup>NS</sup>	-5,818*	-0,01145*
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup> (β<sub>1</sub><sup>2</sup>)</b>	-0,679*	-15,93*	-1,417*	-0,1006*
<b>X<sub>2</sub> (β<sub>2</sub>)</b>	-0,0106 <sup>NS</sup>	-7 <sup>NS</sup>	-1,134*	-0,0666*
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup> (β<sub>2</sub><sup>2</sup>)</b>	-0,5596*	2,64 <sup>NS</sup>	0,250 <sup>NS</sup>	-0,0006 <sup>NS</sup>
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> (β<sub>12</sub>)</b>	-0,0412 <sup>NS</sup>	-28,19*	-0,333 <sup>NS</sup>	-0,0375 <sup>NS</sup>
<b>R<sup>2</sup></b>	95,5%	82,1%	96%	92,8%
<b>R<sup>2</sup> ajusté</b>	92,2%	69,3%	93,2%	87,7%

NS : non significatif, \* : significatif à p < 0,05.

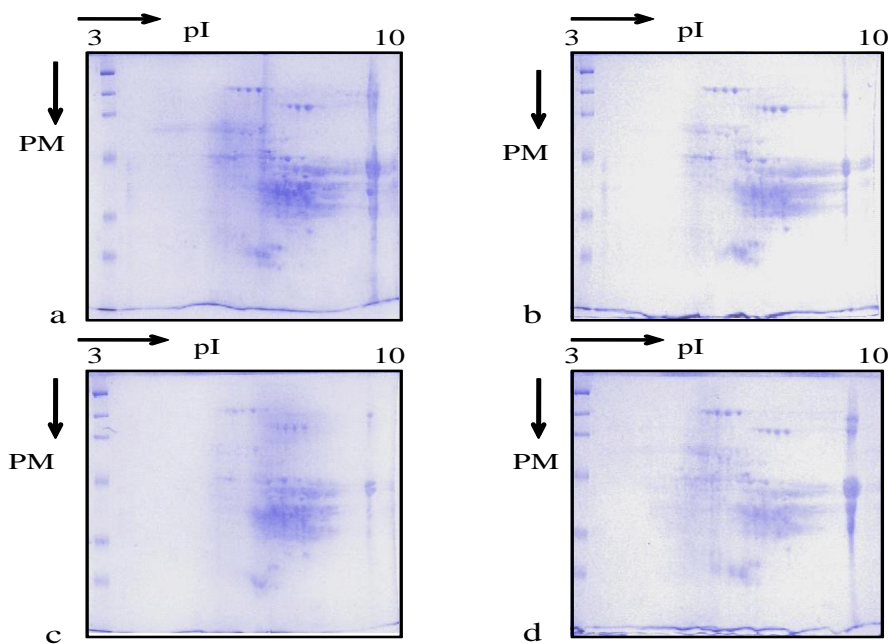
L'analyse de régression multiple de la teneur en groupements thiols libres indique que le modèle est significatif et pourrait expliquer 95,5% de la variance des données. Les modèles de la solubilité, du pouvoir émulsifiant et moussant ont obtenu une variance de données R<sup>2</sup> de 82,1%, 96% et 92,8%, respectivement. Ces résultats statistiques nous permettent de valider les résultats expérimentaux.

### 3.2. Effet de la DIC sur la structure primaire

Les protéines du gluten traitées par la DIC et les protéines du gluten témoin ont été séparées en fonction de leurs poids moléculaires par SDS-PAGE dans des conditions réductrices. La figure 21A illustre les profils électrophorétiques de SDS-PAGE. Les différentes fractions de protéines du gluten ont été déterminées en se référant aux marqueurs de taille et les données de Tatham et Shewry (1985).



A



B

**Figure 21.** Profils électrophorétiques des protéines des glutens témoin et traités par la DIC.

A. Profil de SDS-PAGE dans les conditions réductrices, 1: marqueur de taille (kDa). 2: protéines du gluten témoin. 3-15: protéines des glutens traités par la DIC de G1 à G13. PM : poids moléculaire, pI : pH isoélectrique, SG-HPM : Sous unités de gluténines de haut poids moléculaires, SG-FPM : Sous unités de gluténines de faibles poids moléculaires

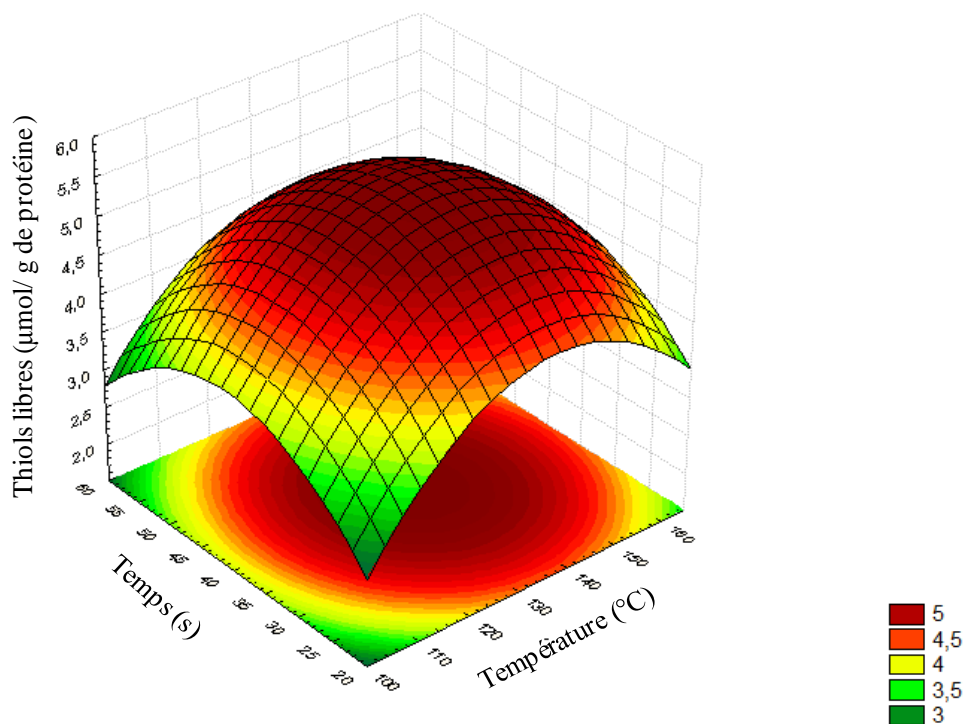
B. Profils de l'électrophorèse bidimensionnelle (EIFxSDS-PAGE), [a: GT gluten témoin , b: G1 (132,5°C, 40s), c: G2 (165°C, 40s), d: G11 (100°C, 40 s)].

Les profils électrophorétiques de treize échantillons des glutens traités par la DIC et celui du gluten non traité ne montrent aucune différence significative entre eux et avec le gluten témoin. Le nombre et l'intensité des bandes de tous les échantillons n'ont pas diminué ou augmenté. Les bandes comprises entre 70 et 90 kDa et entre 30 et 45 kDa, correspondent respectivement aux SG-HPM et SG-FPM. Alors que les bandes allant de 28 à 45 kDa correspondent aux gliadines  $\alpha / \beta$ ,  $\omega$  et  $\gamma$ . Ces résultats suggèrent que le traitement DIC n'induit aucune modification de structure primaire des protéines du gluten et qu'aucune hydrolyse n'est survenue.

Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les glutens traités à des températures différentes (132,5, 165 et 100 ° C) durant le même temps de traitement (40 s) ont été séparés en fonction de leurs points isoélectriques et de leurs poids moléculaires (Figure 21B). Il n'y a pas de différences significatives entre le profil électrophorétique du gluten non traité et les glutens traités par la DIC. Cela signifie que les protéines du gluten de blé ont gardé le même poids moléculaire et la même charge après traitement DIC. Nos résultats sont en accord avec ceux de Boughallout *et al.* (2015), qui ont démontré que les profils électrophorétique de SDS-PAGE des protéines de lait traitées par la DIC, de caséines bovines et de protéines de lactosérum, à 144 ° C pendant 25 s sont identiques à ceux des protéines de lait natives. Néanmoins, cette observation est en désaccord avec l'étude menée par Guillamón *et al.* (2008), qui ont obtenu des profils électrophorétiques de SDS-PAGE de protéines extraites de graines de lupin traitées par la DIC à 132,5 et 159 ° C pendant 1 et 3 min différents à ceux de protéines extraites des graines de lupin non traitées. Ils ont révélé que la bande de la  $\beta$  conglutine a disparu et l'intensité des bandes de l' $\alpha$  conglutine diminue de plus en plus que l'intensité du traitement DIC s'accroît. Ainsi, l'effet du traitement DIC sur les protéines dépend de l'intensité de traitement et la matrice alimentaire.

### **3.3. Effet de la DIC sur les groupements thiols libres et les propriétés rhéologiques**

La figure 22 illustre l'effet du traitement DIC sur la teneur en groupements thiols libres du gluten.



**Figure 22.** Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la teneur en groupement thiols libres des protéines du gluten de blé.

La teneur en groupement thiols libres du gluten témoin est de  $6,43 \pm 0,072$   $\mu\text{mol} / \text{g}$  de protéines, tandis que ses concentrations après traitement DIC sont comprises entre 3 et 5  $\mu\text{mol} / \text{g}$  de protéines. La figure 22 montre que les deux facteurs ont un effet quadratique négatif sur la teneur en thiols libres du gluten traité par la DIC. Selon la surface de réponse, la concentration en groupements thiols libres augmente de 3  $\mu\text{mol} / \text{g}$  à 5  $\mu\text{mol} / \text{g}$  de protéine dans les intervalles de traitement compris entre 100 et 132,5 ° C de température et entre 20 et 40 s de temps de traitement. Alors qu'elle diminue de 5 à 3  $\mu\text{mol} / \text{g}$  de protéine dans les intervalles de traitement de 132,5 à 165 ° C de température et de 40 à 60 s de temps de traitement.

Les liaisons disulfures de protéines du gluten jouent un rôle clé dans la fonctionnalité de la farine de blé. Les gliadines  $\alpha$  et  $\gamma$  contiennent six et huit résidus de cystéine respectivement, conduisant à la formation des liaisons disulfures intramoléculaires contrairement aux  $\omega$  gliadines qui sont en dépourvues. Tandis que les sous-unités de gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM) contiennent des liaisons disulfures intra et intermoléculaires entre elles et avec des sous-unités de gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) formant des polymères de gluténine (Veraverbeke et Delcour, 2002). La quantité des groupements thiols



libres dépend de nombreux facteurs tels que la température, le pH et la pression hydrostatique (Taylor, 2003). Notre résultat indique que la DIC induit probablement une oxydation des groupements thiols libres provoquée par l'utilisation de vapeur saturée et la haute température pendant le traitement (Allaf *et al.* , 2012) amenant à la formation des nouveaux ponts disulfures responsable de l'agrégation des protéines du gluten.

Guerrieri *et al.* (1996) ont rapporté que des modifications des ponts disulfures surviennent à des températures supérieures à 100 °C. Les réarrangements et la formation de ces liaisons peuvent augmenter sous l'effet de haute pression et haute température en déployant la structure native provoquant ainsi une dénaturation et une polymérisation des protéines du gluten de blé (Qu *et al.* , 2017).

La Résistance maximale et l'extension du gluten témoin mesurées par l'analyseur de texture sont successivement  $47,43 \pm 0,1$  g et  $44,96 \pm 1,56$  mm. Après traitement DIC, les échantillons du gluten ont perdu complètement leurs propriétés rhéologiques. Il n'était pas possible de les réhydrater comme le montre la figure 23.



**Figure 23.** Inaptitude des glutens traités par la DIC à la réhydratation (Photographie).

Les protéines du gluten sont capables de former un réseau après hydratation par différents types de réactions et d'interactions, covalentes et non covalentes. L'oxydation des groupements thiols libres (SH) en liaisons disulfures (S-S), augmentant le poids moléculaire des agrégats de gluténine, ainsi que les réactions d'échange SH – SS ont le rôle le plus important dans la formation du réseau du gluten tridimensionnel. Des liaisons non covalentes

comme les liaisons hydrogènes intramoléculaires, dus aux résidus de glutamine, les liaisons hydrophobes, résultant d'interactions de groupes non polaires en présence d'eau, et les interactions ioniques contribuent également à la formation du réseau du gluten (Ooms et Delcour, 2019). Alors que le rôle des liaisons isopeptidiques (Morel *et al.*, 2002) et les ponts dityrosines (Pena *et al.* 2006) est négligeable.

La perte des propriétés rhéologiques malgré la diminution des groupements thiols libres et la formation des nouveaux ponts disulfures suggère que la reformation de réseau du gluten après traitement DIC n'a pas eu lieu à cause probablement des réarrangements désordonnés des ponts disulfures conduisant à la dénaturation des protéines du gluten.

Selon Haddad *et al.* (2001), l'expansion résultant du traitement par la DIC aboutit généralement à une structure poreuse qui facilite la réhydratation des produits. Pour le cas du gluten, c'est complètement l'inverse. La DIC a probablement supprimé la capacité d'hydratation du gluten ce qui a empêché la formation du réseau.

### **3.4. Effet de la DIC sur la structure secondaire**

Une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été réalisée pour étudier les modifications de la structure secondaire du gluten de blé traité par la DIC. La composition de tous les échantillons, non traité et traités par la DIC, sont présentés dans le tableau 14. La déconvolution de la bande de l'amide I [1700, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ] des échantillons du gluten, témoin et traités par la DIC, a permis de déterminer la composition en différentes structures secondaires feuillet  $\beta$  [1687-1690], coudes  $\beta$  [1665-1670], hélice  $\alpha$  [1650-1660], structure aléatoire [1640-1645], feuillet  $\beta$  antiparallèle, [1629-1632] feuillet  $\beta$  intermoléculaire [1612-1614] (Wang *et al.* , 2014).

**Tableau 14.** Pourcentages des composants de la structure secondaire des glutens témoin et traités par la DIC déterminés par spectroscopie FTIR.

Position de la bande (cm <sup>-1</sup> )	[1687,1690]	[1665,1670]	[1650,1660]	[1640,1645]	[1629,1632]	[1612,1614]
Structure secondaire	Feuillets β (%)	Coudes β (%)	Helices α (%)	Structure aléatoire (%)	Feuillets β Antiparalleles (%)	Feuillets β- Intermoléculaires dues aux aggregations (%)
<b>Gluten témoin</b>	7,77±0,01	12,11±0,01	23,88±0,03	30,17±0,04	22,35±0,02	3,73±0,05
<b>G1 (132,5 °C, 40 s)</b>	16,15±0,12****	13,27±0,05****	16,23±0,06****	31,20±0,12****	15,38±0,05****	7,77±0,16****
<b>G2 (165 °C, 40 s)</b>	15,43±0,16****	15,59±0,15****	16,25±0,15****	25,43±0,24****	18,16±0,15****	9,13±0,52****
<b>G3 (132,5 °C, 60 s)</b>	9,62±0,06****	20,08±0,03****	16,43±0,03****	28,03±0,05****	17,36±0,02****	8,48±0,06****
<b>G5 (155,5 °C, 54,1 s)</b>	43,19±0,12****	24,75±0,14****	12,01±0,07****	9,10±0,05****	5,46±0,03****	5,49±0,16****
<b>G6 (155,5 °C, 25,9 s)</b>	13,16±0,21****	17,22±0,13****	15,82±0,12****	27,16±0,21****	15,72±0,12****	10,93±0,37****
<b>G8 (109,5 °C, 25,9 s)</b>	16,86±0,12****	18,22±0,08****	14,10±0,06****	27,63±0,13****	14,33±0,05****	8,85±0,2****
<b>G9 (109,5 °C, 54,1 s)</b>	43,91±0,16****	8,51±0,06****	6,16±0,04****	23,22±0,16****	8,93±0,0****	9,27±0,16****
<b>G11 (100 °C, 40 s)</b>	17,80±0,11****	16,03±0,07****	12,18±0,05****	22,44±0,09****	24,31±0,05****	7,24±0,15****
<b>G12 (132,5 °C, 20 s)</b>	16,62±0,14****	14,28±0,06****	14,88±0,06****	31,55±0,13****	16,78±0,03****	5,89±0,13****

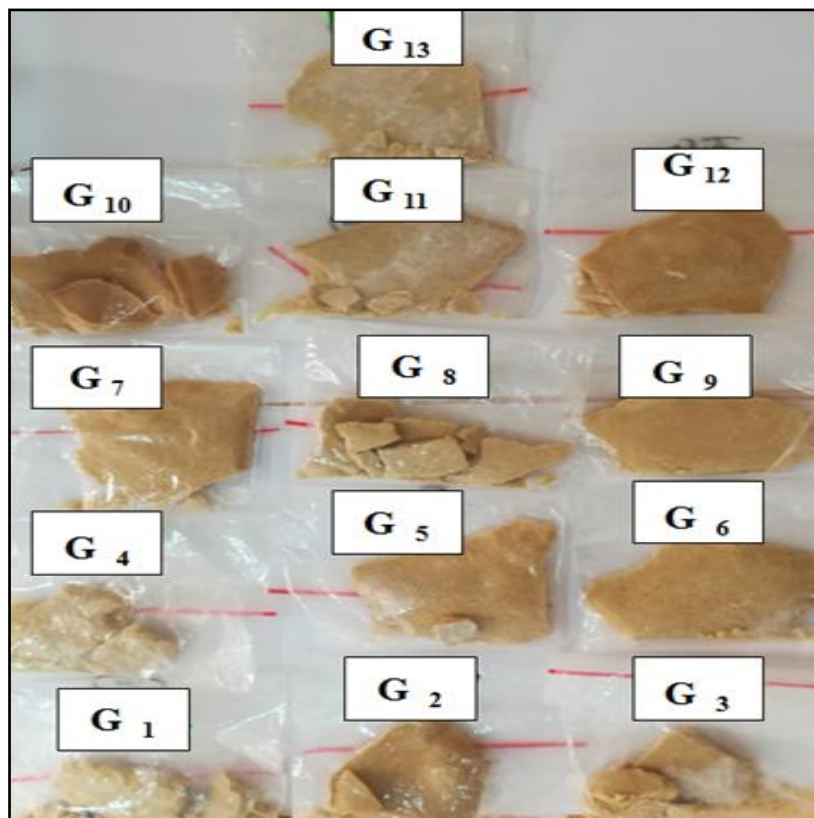
Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

D'après le tableau 14, le gluten témoin contient  $7,77 \pm 0,01$  % de feuillets  $\beta$ ,  $12,11 \pm 0,01$  % de coudes  $\beta$ ,  $23,88 \pm 0,03$  % d'hélices  $\alpha$ ,  $30,17 \pm 0,04$  % de pelote statistique,  $22,35 \pm 0,02$  % de feuillets  $\beta$  antiparallèles et  $3,73 \pm 0,05$  % de feuillets  $\beta$  intermoléculaires. Ces résultats sont conformes avec ceux de Wang *et al.* (2015) qui ont indiqué que les structures secondaires prédominantes dans le gluten non hydraté sont les feuillets  $\beta$  et pelote statistique aléatoire et qui se transforment en coudes  $\beta$  à l'état hydraté. Cependant, nos résultats sont différents à ceux rapportés par Nawrocka *et al.* (2016) qui ont trouvé que le gluten de blé extrait de la pâte contient 11 % de feuillets  $\beta$ , 13 % de coudes  $\beta$ , 60 % d'hélices  $\alpha$ , 8 % de feuillets  $\beta$  anti-parallèle et 8 % d'agrégats. Cette différence peut être attribuée à de nombreux facteurs liés au processus d'extraction et de séchage tels que le lessivage, la lyophilisation et la pulvérisation (Nawrocka *et al.* , 2016). Cette différence est probablement liée aussi aux variétés de blé utilisées pour la fabrication de la farine.

Les résultats de FTIR mentionnés dans le tableau 14 montrent que le traitement DIC a induit des changements de la structure secondaire du gluten de blé. Des différences significatives entre tous les composants de la structure secondaire de témoin et ceux du gluten traité par la DIC ont été enregistrées. D'après les résultats obtenus, la structure des feuillets  $\beta$  des glutens traités par la DIC allant de 9,62% à 43,91% a augmenté par rapport au gluten témoin ( $7,77 \pm 0,01\%$ ). Ces résultats sont en accord avec ceux de Georget et Belton (2006) qui ont montré que l'hydratation et le chauffage induisent des changements dans la structure de feuillet  $\beta$ . Ce changement a été provoqué par la faible hydratation due à la condensation de la vapeur à la surface du gluten et par la température élevée pendant le traitement DIC. Concernant la structure coudes  $\beta$ , le gluten témoin contient  $12,11 \pm 0,01$  %. Alors qu'après traitement DIC, leurs pourcentages, compris entre 13,27 et 24,75 %, ont augmenté significativement à l'exception de celui du gluten 9 ( $109,5$  °C, 54,1s) qui est de  $8,51 \pm 0,06$  %. De même, les feuillets  $\beta$  intermoléculaires dues à l'agrégation de protéines, compris entre 5,49% et 10,93%, ont montré une augmentation significative par rapport à ceux du gluten témoin ( $3,73 \pm 0,05$  %). Par contre, les feuillets  $\beta$  antiparallèles ont diminué par rapport à ceux du gluten non traité ( $22,35 \pm 0,02$  %), à l'exception de ceux du gluten 11 ( $100$  °C, 40 s) qui contient  $24,31 \pm 0,05\%$ . Une perte significative a été observée pour la structure hélice  $\alpha$ . Le gluten témoin contient  $23,88 \pm 0,03$  % d'hélice  $\alpha$  tandis qu'après traitement DIC, son pourcentage est compris entre 6,16 % et 16,43 %. Concernant la pelote statistique, structure non ordonnée, une diminution significative a été enregistrée sauf pour les glutens 1

(132,5 °C, 40 s) et gluten 12 (132,5 ° C, 20 s) dont leurs teneurs sont  $31,20 \pm 0,12 \%$  et  $31,55 \pm 0,13 \%$  respectivement.

Selon Wang *et al.* (2014), l'augmentation des structures  $\beta$  est traduite par une structure plus hydrophobe et rigide expliquant la rigidité et la dureté de la poudre du gluten de blé après traitement DIC (Figure 24). D'après Yong *et al.* (2006), la structure coude  $\beta$  est composée principalement de deux acides aminés qui sont le glutamate et l'asparagine et la structure feuillet  $\beta$  est formée de résidus de glutamine dans le gluten. Par conséquent, les coudes  $\beta$  ont augmenté en raison de la libération de glutamate et asparagine.



**Figure 24.** Expansion, rigidité et brunissement des échantillons du gluten après traitement DIC (Photographie).

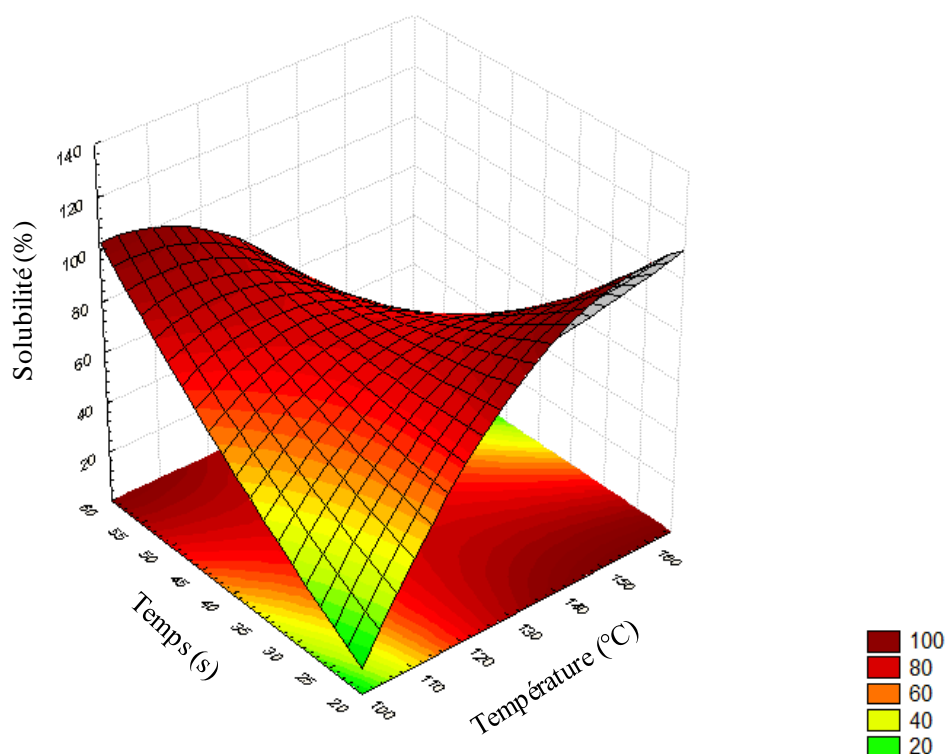
Ces changements de structure secondaire induits par le traitement DIC signifient que ce traitement a probablement provoqué le déploiement de la structure secondaire de protéines du gluten autrement dit une dénaturation partielle de structure.

Guerrierri *et al.* 1996 ont affirmé que la dénaturation du gluten de blé commence à partir d'une température supérieure à 80 °C. En outre, Mounir et Allaf (2014) ont révélé que le

traitement DIC, comme tout traitement thermique, entraîne une dénaturation irréversible des protéines des cellules de microorganismes.

### 3.5. Effet de la DIC sur les propriétés fonctionnelles

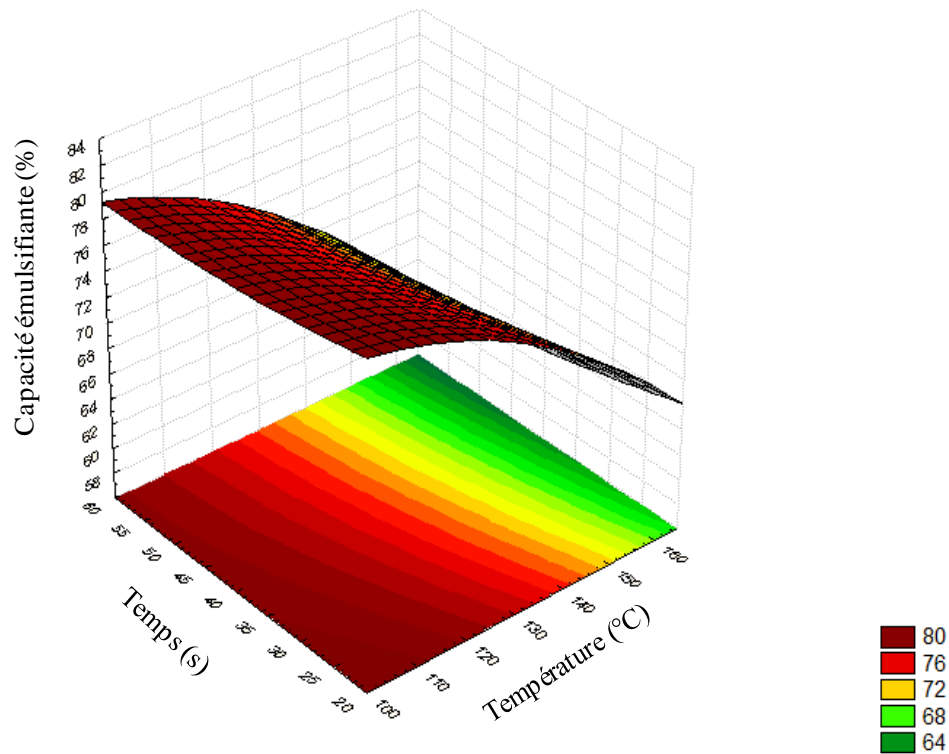
Le gluten peut être utilisé comme additif dans diverses applications en raison de ses propriétés souhaitables pour l'amélioration de la structure (Agyare *et al.*, 2009). La figure 25 présente la surface de réponse de l'effet du traitement DIC sur la solubilité des protéines du gluten.



**Figure 25.** Surface de réponse de l'effet du traitement DIC sur la solubilité des protéines du gluten de blé.

La solubilité des protéines du gluten témoin est de 100 %. D'après la figure 25, ce traitement thermique a réduit considérablement la solubilité des protéines du gluten, passant de 100 à 20%. Un effet quadratique négatif de la température et un effet interactif négatif sur la solubilité des protéines du gluten ont été observés. Les valeurs minimales de solubilité ont été obtenues à 100 °C pendant 20 s et à 165 °C pendant 60 s. Alors que les valeurs maximales ont été obtenues à 100 °C pendant 60 s et à 165 °C pendant 20 s.

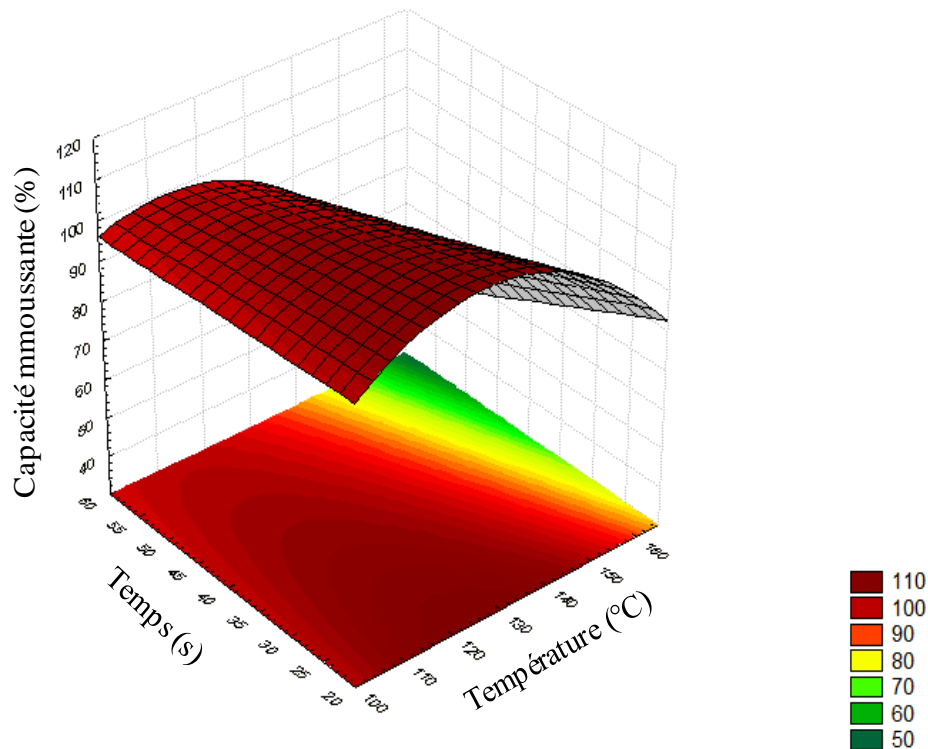
En général, la capacité émulsifiante (CE) est la première propriété fonctionnelle déterminée lors du développement et de la mise à l'essai de nouveaux ingrédients protéiques (Zayas, 1997). La figure 26 illustre l'effet du traitement DIC sur la CE.



**Figure 26.** Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la capacité émulsifiante des protéines du gluten de blé.

Les valeurs de CE pour le gluten traité par la DIC varient de 65% à 80% et sont inférieures à celle de CE du gluten non traité qui est de  $88,33 \pm 5,55$  %. La surface de réponse montre que la température et le temps de traitement ont un effet négatif linéaire sur la CE. De plus, la température a un effet quadratique négatif. Les valeurs maximales de la CE (80%) correspondent à la température la plus basse (100 ° C) et du temps de traitement le plus court (20 s) et vice versa.

En ce qui concerne la capacité de moussante (CM), le même effet du traitement DIC a été observé (Figure 27).



**Figure 27.** Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la capacité moussante des protéines du gluten de blé.

Ce traitement a atténué la CM. Toutes les valeurs de CM des glutens traités par la DIC, variant de 50 à 110%, sont inférieures à celle du gluten témoin, qui est de  $130 \pm 31$  %. Les deux facteurs, température et temps de traitement, ont un effet linéaire négatif sur la capacité moussante. Un effet quadratique négatif de la température est également observé. La plus faible capacité moussante des protéines du gluten de blé traité par la DIC est obtenue dans les conditions de traitement les plus sévères (165 ° C pendant 60 s). Alors que les valeurs maximales sont enregistrées dans une large zone (100 à 150 ° C pendant 20 à 55 s). Une corrélation significative entre la CE et la CM ( $r = 0,814$ ,  $p = 0,001$ ) a été enregistrée.

Les propriétés fonctionnelles des protéines sont influencées par de nombreux facteurs tels que la source, le pH, la concentration, la solubilité et la température. La solubilité des protéines est principalement liée à la teneur en liaisons hydrogène et en résidus hydrophobes et hydrophiles localisés à la surface. La solubilité résulte des propriétés actives de protéines telles que les propriétés moussantes, émulsifiantes et liantes. Cette surface active dépend principalement de la composition et de la distribution des acides aminés, de la flexibilité



moléculaire et, dans une moindre mesure, de la forme et de la taille de la protéine (Hall, 1996).

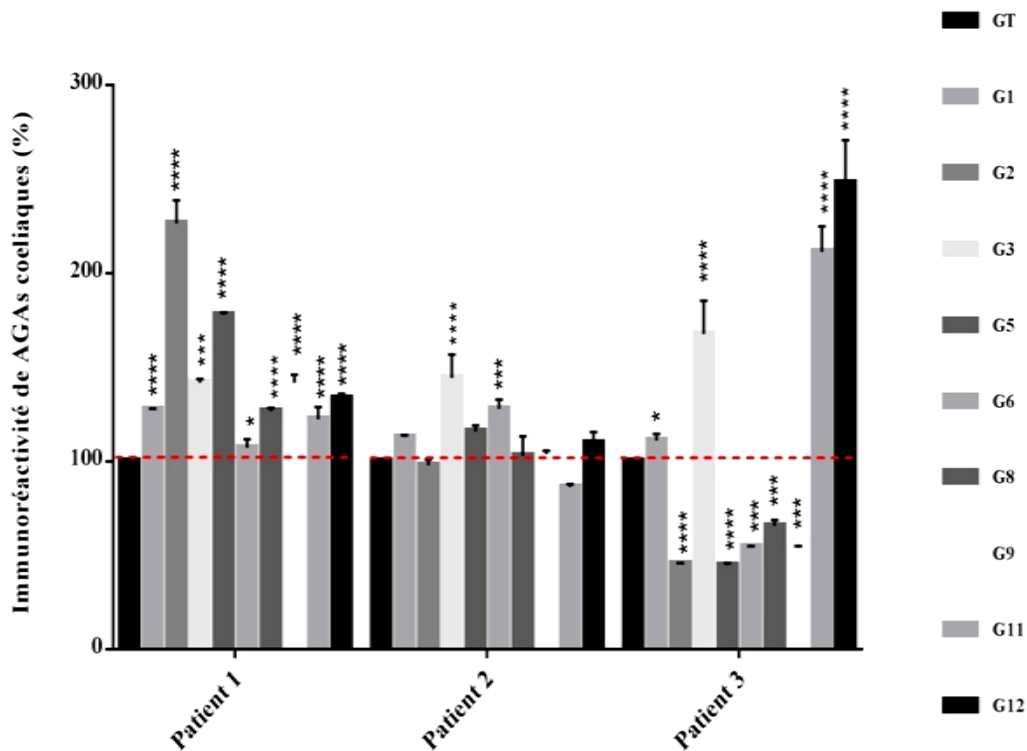
La solubilité est affectée par le degré de traitement thermique et non thermique, tel que le procédé DIC, qui combine la pression de la chaleur et de la vapeur pendant un temps court, suivi d'une chute de pression instantanée dans le vide. Ces méthodes de traitement conduisent à la formation d'oligomères, à des modifications de l'hydrophobicité de surface et à la dénaturation de protéines responsables de la réduction de la solubilité (Guerrieri *et al.*, 1996).

Han *et al.* (2018) ont rapporté que les propriétés fonctionnelles dépendent de la structure secondaire. Les modifications de la structure de la protéine peuvent altérer les propriétés fonctionnelles, notamment la solubilité, la viscosité, les propriétés émulsifiantes, moussantes, immunoréactives et gélifiantes. Ces résultats sont en accord avec nos résultats de FTIR. L'augmentation de l'hydrophobicité due à l'augmentation des structures  $\beta$  (coudes  $\beta$ , feuillets  $\beta$  et feuillets  $\beta$  intermoléculaires) est probablement responsable de la réduction de la solubilité des protéines. Malgré la courte durée du traitement DIC (20 à 60 s), la température élevée appliquée dans ce traitement entraîne une diminution de la solubilité. Notre résultat est en accord avec celui de Morel *et al.* (2002) qui ont démontré que le traitement thermique induit la perte de la solubilité du gluten de blé.

La capacité émulsifiante et moussante des protéines sont les propriétés fonctionnelles les plus affectées par la solubilité (Fennema, 1996). L'abaissement de ces propriétés sous traitement DIC pourrait être expliqué par la réduction de la solubilité.

### **3.6. Effet de la DIC sur l'immunoréactivité des anticorps anti-gliadines**

L'immunoréactivité des anticorps IgA anti-gliadines de la gliadine extraite des glutens non traité et traités par la DIC a été déterminée par le test ELISA Indirect non compétitif en utilisant trois sérums de patients atteints de la maladie cœliaque. La figure 28 représente l'effet de traitement DIC sur l'immunoréactivité des anticorps IgA anti-gliadine.



**Figure 28.** Effet de la DIC sur l’immunoréactivité des anticorps anti-gliadines cœliaques (AGAs).

Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$   
 GT : gluten témoin , G1 (132,5°C, 40s) , G2 (165 °C,40 s), G3 (132,5 °C, 60s), G5 (155,5 °C, 54,1s), G6 (155,5 °C, 25,9 s), G8 (109,5 °C,25,9 s) , G9 (109,5 °C, 54,1 s), G11 (100 °C, 40s),  
 G12 (132,5 °C, 20 s).

Pour le patient 1, l’immunoréactivité du gluten traité par la DIC varie entre  $107,22 \pm 4,69\%$  et  $226,54 \pm 12,29\%$  correspondent respectivement à l’immunoréactivité des échantillons du gluten 6 (155,5 °C, 25,9 s) et gluten 2 (165 °C, 40 s). Il existe une différence significative entre l’immunoréactivité du gluten témoin (100%) et celles des glutens traités par la DIC ( $p < 0,0001$ ). Ces résultats indiquent que la capacité de liaison des glutens traités par la DIC aux anticorps IgA a considérablement augmenté pour ce malade.

Pour le patient 2, l’immunoréactivité est passée de  $86,24 \pm 1,58\%$  à  $144,37 \pm 12,55\%$ , ce qui correspond successivement à l’immunoréactivité du gluten 11 (100 °C, 40 s) et gluten 3 (132,5 °C , 60 s). Les résultats de l’ANOVA montrent qu’il existe une différence significative entre l’immunoréactivité entre tous les échantillons ( $p < 0,0001$ ). La comparaison multiple a montré que seules les valeurs d’immunoréactivité du gluten 3 (132,5 °C, 60 s) et gluten 6 (155,5 °C, 25,9 s) sont significativement différentes de celle du gluten témoin.

L'immunoréactivité des anticorps d'isotype IgA de patient 3 aux gliadines extraites des glutens traités par la DIC est comprise entre  $44,79 \pm 1,04\%$  et  $247,91 \pm 22,91\%$  qui correspondent au gluten 5 ( $155,5^\circ\text{C}$ , 54,1 s) et gluten 12 ( $132,5^\circ\text{C}$ , 20 s) successivement. Les résultats de l'ANOVA ont montré qu'il y a une différence significative entre l'immunoréactivité des glutens traités par la DIC ( $p < 0,0001$ ). Comparativement à l'immunoréactivité du gluten témoin de 100%, l'immunoréactivité du gluten 1 ( $132,5^\circ\text{C}$ , 40 s), gluten 3 ( $132,5^\circ\text{C}$ , 60 s), gluten 11 ( $100^\circ\text{C}$ , 40s) et gluten 12 ( $132,5^\circ\text{C}$ , 20 s) a montré une augmentation significative. Par contre l'immunoréactivité du gluten 2 ( $165^\circ\text{C}$ , 40 s), gluten 5 ( $155^\circ\text{C}$ , 54,1 s), gluten 6 ( $155,5^\circ\text{C}$ , 25,9 s), gluten 8 ( $109,5^\circ\text{C}$ , 25,9 s) et gluten 9 ( $109,5^\circ\text{C}$ , 54,1 s) est inférieure à celle du gluten témoin.

Ces résultats démontrent que le même traitement DIC a des effets différents sur la liaison des IgA de trois malades aux gliadines. Cela peut être lié à l'âge des patients et aux épitopes immunogènes (Ciccocioppo *et al.*, 2005, Cabrera-Chávez *et al.*, 2008). Les épitopes immunodominants sont reconnus par presque tous les malades cœliaques alors que les épitopes simplement immunogènes sont reconnus par uniquement quelques malades. La toxicité du gluten dans la maladie cœliaque est due à une réponse immunitaire impliquant les deux systèmes immunitaires, inné et adaptatif, et la réponse immunologique varie considérablement entre les patients atteints de cette maladie (Di Sabatino et Corazza, 2009).

De manière générale, la DIC a augmenté l'immunoréactivité des anticorps IgA anti-gliadine. L'alpha-gliadine est identifiée comme étant la protéine de blé la plus immunogène vis-à-vis de la maladie cœliaque, suivie par les  $\gamma$ -gliadines et les gluténines (Scherf *et al.*, 2016). Selon Leszczynska *et al.* (2003), les modifications conformationnelles des protéines alimentaires induites par un traitement thermique sévère sont connues pour affecter les propriétés de reconnaissance immunitaire. Les modifications structurales du gluten traité par la DIC détectées par FTIR pourraient conduire à une exposition plus importante des épitopes immunogènes des gliadines et leur démasquage pourrait expliquer l'augmentation marquée de l'immunoréactivité du gluten.

De nombreux épitopes toxiques se trouvent dans des zones caractérisées par des conformations stabilisées par des liaisons disulfures (Henderson *et al.*, 2007 ; Salentijn *et al.*, 2012). L'augmentation des coudes  $\beta$  résultait d'un réarrangement contenant le peptide 33-mer d' $\alpha$ -gliadine (résidus de 57-89) pourrait également expliquer cette augmentation (Tatham et Shewry, 1985). Les changements de couleur du gluten traité par la DIC (Figure 24) associé

aux produits de brunissement non enzymatiques, une réaction entre les protéines et les sucres du gluten, peuvent également affecter l'allergénicité des protéines (Gruber *et al.* , 2004 ; Taheri-Kafrani *et al.* , 2009).

### 3.7. Effet de la DIC sur la quantité des épitopes potentiellement toxiques du gluten de blé et des pains à base de blé

#### 3.7.1. Ajustement du modèle

Les résultats de l'analyse de régression multiple de la quantité des épitopes potentiellement toxiques des glutens et de trois types de pain à base de blé traités par la DIC selon des conditions plus intenses sont mentionnés dans le tableau 15. L'adéquation du modèle est indiquée par un coefficient de détermination satisfaisant ( $R^2 > 70\%$ ) (Granato et de Araújo Calado, 2014).

**Tableau 15.** Coefficients de régression pour les surfaces de réponse des glutens de blé et des différents types de pain traités par la DIC.

	Réactivité de R5			
	Gluten	Pain à base de farine de blé tendre	Pain à base de semoule de blé dur	Pain commercial
<b>Constante</b>	699061*	177013*	106643*	286975*
<b>X<sub>1</sub> (β<sub>1</sub>)</b>	28202 <sup>NS</sup>	20454*	45801*	-18582*
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup> (β<sub>1</sub><sup>2</sup>)</b>	3969 <sup>NS</sup>	-4167 <sup>NS</sup>	75922*	-14360*
<b>X<sub>2</sub> (β<sub>2</sub>)</b>	-12757 <sup>NS</sup>	-10382 <sup>NS</sup>	41503*	-5159 <sup>NS</sup>
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup> (β<sub>2</sub><sup>2</sup>)</b>	-53686 <sup>NS</sup>	7058 <sup>NS</sup>	-14575 <sup>NS</sup>	-50178 *
<b>X<sub>1</sub>X<sub>2</sub> (β<sub>12</sub>)</b>	127116*	-12575 <sup>NS</sup>	68076*	4056 <sup>NS</sup>
<b>R<sup>2</sup></b>	56,4%	49,0%	91,0%	95,1%
<b>R<sup>2</sup> ajusté</b>	25,3%	12,6%	84,5%	91,6%

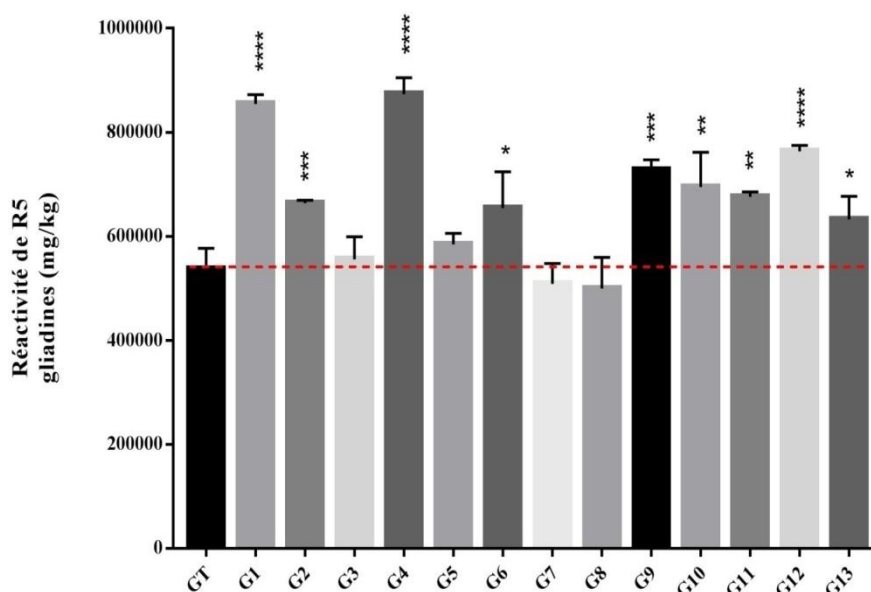
NS : non significatif, \* : significatif à  $p < 0,05$ .

L'analyse de régression multiple de la quantité des épitopes toxiques du gluten et de pain à base de farine blé tendre montre que les modèles ne sont pas significatifs ( $R^2 < 70\%$ ). Leurs modèles ont obtenu une variance de données  $R^2$  de 56,4% et 49% respectivement. Les modèles non significatifs ne sont pas représentés par la surface de réponse.

Alors que, l'analyse de régression multiple de pain à base de semoule de blé et de pain commercial indique que les modèles sont significatifs et pourraient expliquer 91,0% et 95,1% de la variance des données successivement.

### 3.7.2. Effet de la DIC sur les épitopes potentiellement toxiques du gluten

L'immunoréactivité des échantillons du gluten traités par la DIC est mesurée à travers la quantification des épitopes potentiellement toxiques par ELISA R5 compétitif. Les teneurs en épitopes sont représentées dans la figure 29.



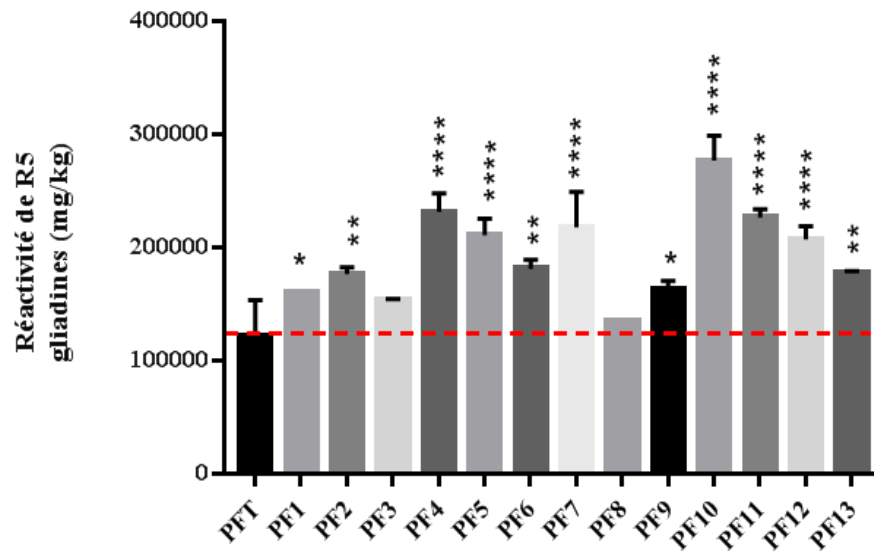
**Figure 29.** Immunoréactivité de l'anticorps R5 avec les glutens traités par la DIC et le gluten témoin mesurée après digestion peptique et trypsique.

Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

La quantité des épitopes contenue dans le gluten témoin est de 536,849 g de gliadine/kg alors que celle des glutens traités par la DIC est comprise entre 499,675 et 873,393 g de gliadine /kg. La quantité des épitopes après traitement DIC a augmenté significativement. Cependant aucune différence significative n'a été enregistrée entre la quantité des épitopes de témoin et celles du gluten 3 (109,5°C, 108,28 s), gluten 5 (100 °C, 80 s), gluten 7 (132,5 °C, 40 s) et gluten 8 (109,5 °C, 120 s). Ce résultat confirme les premiers résultats d'ELISA indirect qui indiquent que la DIC augmente l'accessibilité aux épitopes toxiques.

### 3.7.3. Effet de la DIC sur les épitopes potentiellement toxiques des pains à base de blé

La quantité des épitopes toxiques, exprimée en g de gliadine/kg pour chaque type de pain, a été évaluée par ELISA R5 compétitif. La figure 30 illustre l'effet de la DIC sur la quantité des épitopes potentiellement toxiques.

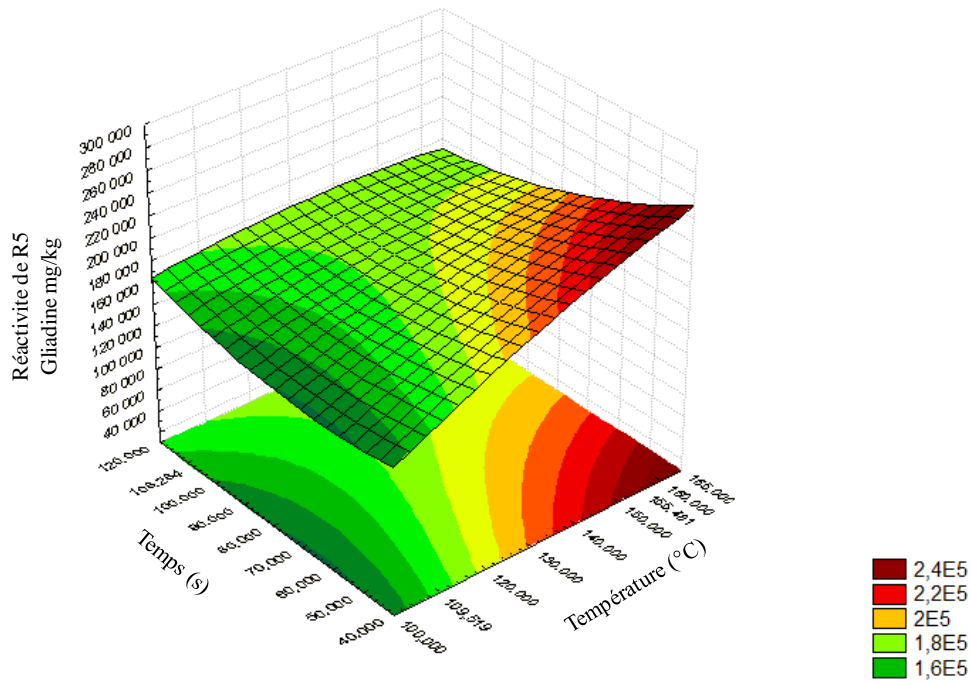


**Figure 30.** Immunoréactivité de l'anticorps R5 avec le pain à base de farine traité par la DIC et le pain non traité mesurée après digestion peptique et trypsique.

Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,01$ , \*\*\* :  $p < 0,001$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

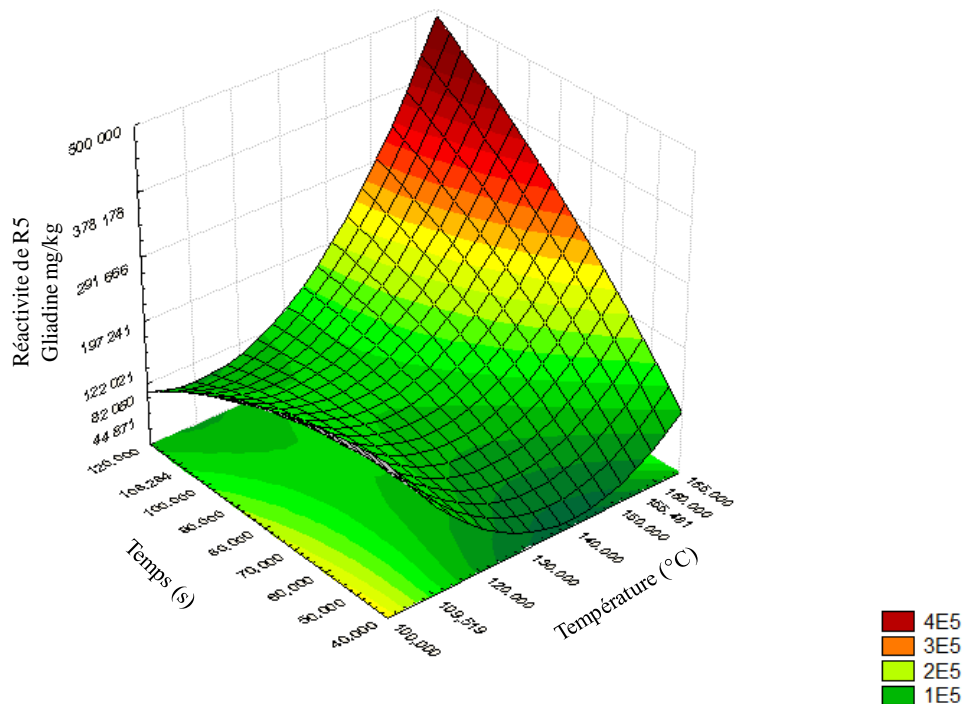
Le pain à base de farine de blé tendre contient 164,300 g de gliadine/kg. Ses tranches traitées par la DIC contiennent une quantité des épitopes toxiques comprise entre 134,59 et 242,818 g de gliadine/kg. Une augmentation significative de la quantité des épitopes potentiellement toxiques a été enregistrée (Figure 30). Néanmoins, les pains traités par la DIC à 109,5°C pendant 108,28 s et à 109,5 °C pendant 120 s contiennent une quantité des épitopes toxiques aussi que celle de pain témoin.

Après traitement DIC, la quantité des épitopes toxiques pour le pain commercial varie entre 176,514 et 293,38 g de gliadine/kg, contre 44,871 à 378,178 g de gliadine/kg pour le pain à base de semoule de blé dur (Figure 31 et 32).



**Figure 31.** Surface de réponse de l'effet de la DIC sur les épitopes toxiques potentiels du pain à base de semoule de blé dur.

Les quantités d'épitopes toxiques pour le pain commercial et le pain à base de semoule ont augmenté globalement par rapport à celle des pains non traités qui sont, respectivement, de 201,728 et 130,97 g de gliadine /kg.



**Figure 32.** Surface de réponse de l'effet de la DIC sur les épitopes toxiques potentiels du pain commercial.

Cependant, les effets de chacun des paramètres de traitement DIC (température et temps) sur la quantité des épitopes contenues dans les pains étudiés étaient différents. Pour le pain à base de semoule, l'analyse de la surface de réponse a montré que la température et le temps de traitement ont un effet linéaire significatif positif ainsi qu'un effet interactif significatif positif. Par contre pour le pain commercial, la température a un effet linéaire significatif négatif. En outre, les deux paramètres, température et temps, ont également un effet quadratique négatif.

Le gluten formé après hydratation joue un rôle crucial dans la panification. Durant le processus de cuisson de pain, les protéines de blé, y compris les protéines du gluten, se dénaturent pour former la structure du pain et contribuent significativement aux caractéristiques des produits cuits au four. Les propriétés de dénaturation thermique du réseau jouent un rôle clé dans la qualité boulangère des pâtes (Wang *et al.*, 2014). Malgré la dénaturation des protéines du gluten pendant la cuisson de pain, la DIC a augmenté de plus en plus l'immunoréactivité des pains. Cela signifie que ce traitement a augmenté le degré de dénaturation des protéines du gluten et la quantité des épitopes toxiques.

Par l'augmentation de la quantité d'épitopes toxiques enregistrée et de l'immunoréactivité qui en dépend, ces résultats viennent de révéler que le traitement DIC des tranches de pain affecte aux niveaux moléculaires le réseau protéique installé avec possibilités de modifications et réarrangements structurels.

#### **4. Effets du traitement Micro-ondes sur les protéines du gluten de blé**

Les effets de Micro-ondes sur la poudre du gluten ont été évalués par le biais de plusieurs paramètres qui sont la température maximale atteinte après le traitement Micro-ondes, la teneur en eau, la teneur en différentes protéines du gluten, la teneur en groupements thiols libres, l'abondance de la structure secondaire et les caractéristiques macromoléculaires de polymères, l'extractibilité des protéines du gluten, la résistance maximale à l'extension ( $R_{max}$ ), l'extensibilité totale (Ext) et la réactivité R5 après digestion peptique et trypsique.

##### **4.1. Ajustement du modèle**

Les coefficients de régression avec leurs significations observés par ANOVA testant l'effet linéaire, quadratique et interaction des deux facteurs, puissance ( $X_1$ ) et temps de traitement ( $X_2$ ), sont présentés dans le tableau 16.



**Tableau 16.** Coefficients de régression pour les surfaces de réponse des glutens de blé traités par Micro-ondes.

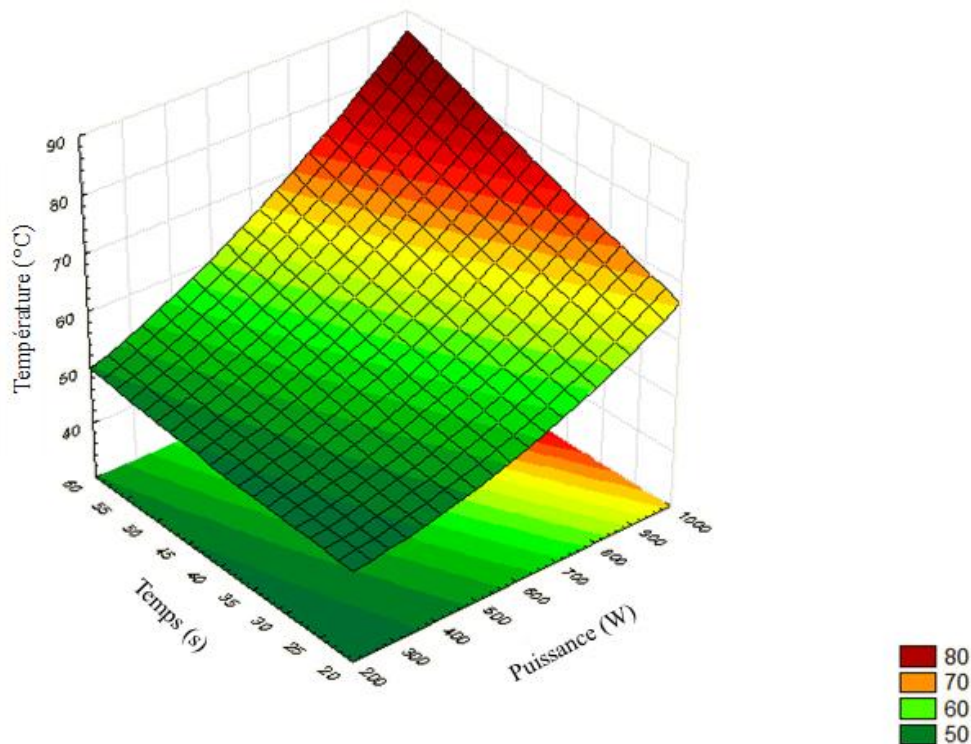
Source	T°	Teneur en eau	Gliadines	Gluténines	R <sub>max</sub>	Ext	Thiols libres	Réactivité R5
Constante	58,05*	7,12*	60,50*	11,92*	100,60*	59,14*	5,28*	271407,7*
X <sub>1</sub> (β <sub>1</sub> )	10,11*	-0,58*	2,91*	-0,074 <sup>NS</sup>	18,06*	1,81*	-0,099 <sup>NS</sup>	1637,0 <sup>NS</sup>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> (β <sub>1</sub> <sup>2</sup> )	1,78*	-0,055 <sup>NS</sup>	-2,83*	-0,12 <sup>NS</sup>	-0,67 <sup>NS</sup>	-4,34*	0,030 <sup>NS</sup>	2159,0 <sup>NS</sup>
X <sub>2</sub> (β <sub>2</sub> )	4,26*	-0,10 <sup>NS</sup>	3,67*	-0,56 <sup>NS</sup>	-5,11*	-2,17*	0,076 <sup>NS</sup>	-1047,1 <sup>NS</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup> (β <sub>2</sub> <sup>2</sup> )	0,33 <sup>NS</sup>	-0,027 <sup>NS</sup>	-2,71*	0,27 <sup>NS</sup>	4,33 <sup>NS</sup>	-6,63*	-0,050 <sup>NS</sup>	-544,1 <sup>NS</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> (β <sub>12</sub> )	2,10*	-0,043 <sup>NS</sup>	1,41 <sup>NS</sup>	0,42 <sup>NS</sup>	11,20*	-6,87*	-0,035 <sup>NS</sup>	11872,0 <sup>NS</sup>
R <sup>2</sup>	92,5	73,2	72,1	43,4	70,6	93,25	35,6	8,97
R <sup>2</sup> (ajusté)	87,1	54,1	52,1	3,04	49,6	88,4	0,000	0,000

NS : non significatif, \* : Significatif à  $p < 0,05$ .

Le coefficient de détermination R<sup>2</sup> (> 70%) indiquent un bon ajustement du model pour la température maximale atteinte pendant le traitement, la teneur en eau, les gliadines extractibles, la résistance maximale à l'extension et l'extensibilité totale (Tableau 16). Alors que, l'analyse de régression pour les gluténines extractibles, la teneur en groupements thiols libres et la réactivité R5 a montré que le modèles ne décrit pas bien les réponses dans l'intervalle de puissance (200-1000 W) et le temps de traitement (20 à 60 s). La représentation des surfaces de réponses ne concerne que les modèles significatifs.

#### 4.2. Effet du traitement Micro-ondes sur la température maximale atteinte

L'effet du traitement Micro-ondes sur la température maximale atteinte est illustré dans la figure 33.

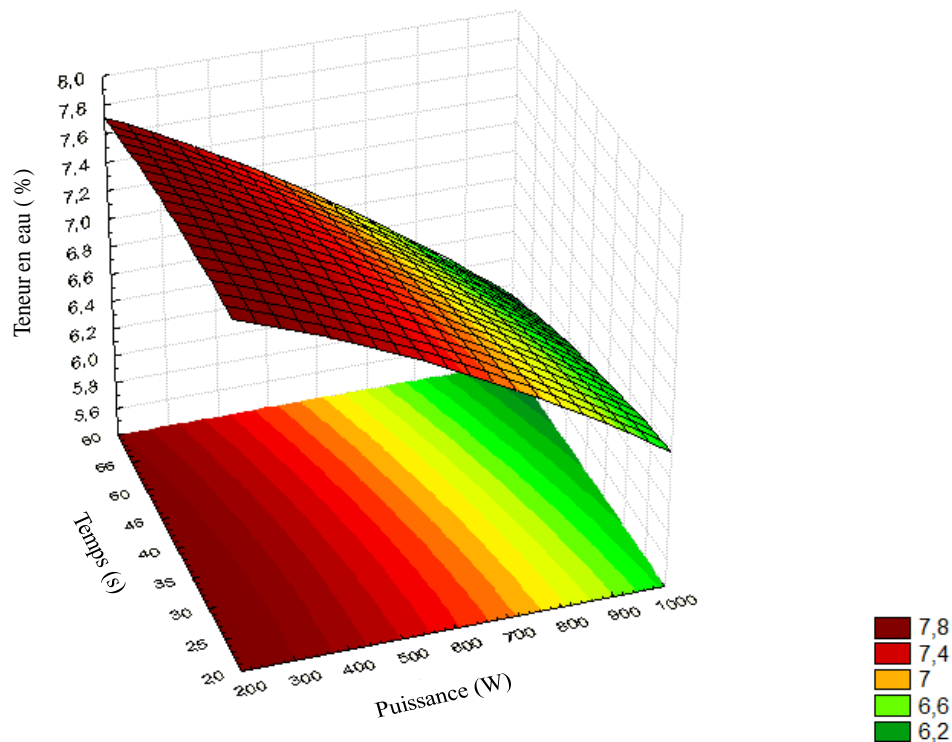


**Figure 33.** Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur la température atteinte.

La température atteinte des échantillons après traitements Micro-ondes est comprise entre 41,85 °C du gluten 5 (200W, 40s) et 77,80 °C du gluten 6 (1000W, 40s). Selon la surface de réponse, la teneur en eau dans ces conditions de traitements est comprise entre 50 et 80°C. La vibration des molécules d'eau et des ions chargés lorsqu'ils sont exposés aux Micro-ondes est la base de la conversion de l'énergie électromagnétique des Micro-ondes en énergie thermique. En outre, les Micro-ondes permettent un chauffage plus rapide que les autres méthodes conventionnelles, par la pénétration directe de Micro-ondes (Tang et Resurreccion, 2009). Pour la puissance utilisée, des effets linéaire et quadratique sont trouvés significatifs. La puissance et le temps de traitement ont un effet significatif linéaire positif sur la température du gluten. La température augmente avec l'augmentation de la puissance et de temps de l'exposition aux Micro-ondes. Cependant l'effet de la puissance appliquée sur la température atteinte est plus prononcé que celui de temps de traitement. De plus, une interaction entre les deux paramètres est également observée.

#### 4.3. Effet du traitement Micro-ondes sur la teneur en eau

La figure 34 montre l'effet de traitement par Micro-ondes sur l'humidité du gluten de blé.



**Figure 34.** Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur la teneur en eau.

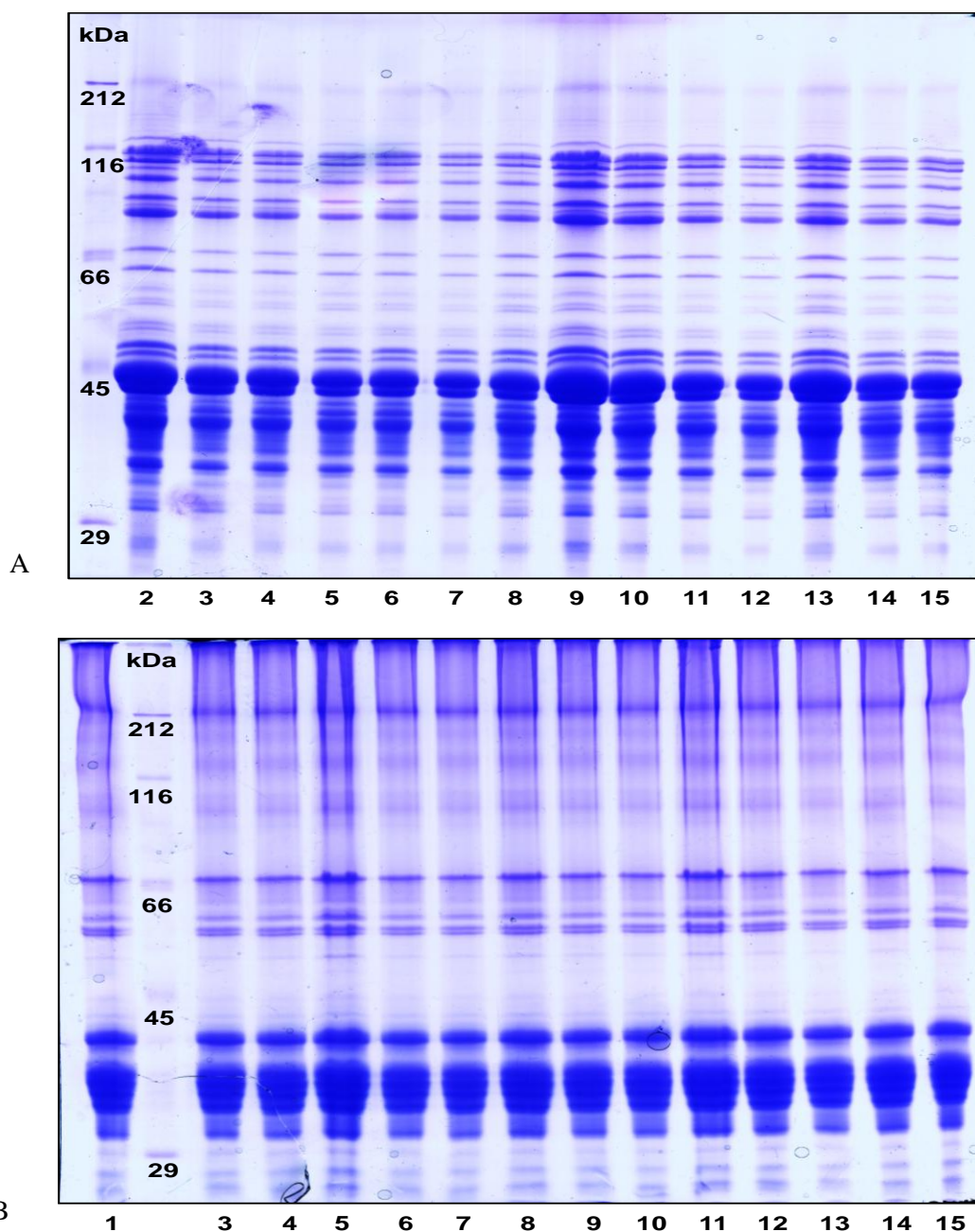
Les valeurs des teneurs en eau des glutens traités par Micro-ondes varient entre 6,5 et 7,5 %, tandis que celle du gluten témoin est de  $8,29 \pm 0,056$  %. La teneur en eau est affectée seulement par la puissance qui a un effet linéaire négatif. En effet, la teneur en eau de tous les échantillons traités par Micro-ondes diminuent et il existe une corrélation négative significative ( $r = -0,7535$ ,  $p = 0,0029$ ) entre la température et la teneur en eau comme prévu. La chaleur produite par les radiations Micro-ondes a entraîné une déshydratation du gluten. Notre résultat est similaire à celui de Diraman (2010).

Le chauffage des échantillons par Micro-ondes entraîne l'évaporation de l'eau libre causant un gradient de pression de vapeur qui réduit l'humidité des échantillons. De plus, le processus de séchage se produit rapidement sans surchauffer l'atmosphère ou la surface car la pénétration directe de Micro-ondes génère la chaleur de manière globale au lieu de nécessiter une conduction de la surface (Bouraoui *et al.*, 1994).

#### 4.4. Effet du traitement Micro-ondes sur la structure primaire

Afin d'étudier l'effet de Micro-ondes sur la structure primaire des protéines du gluten, une séparation électrophorétique des gluténines et des gliadines extraites du gluten, non traité et traitées par Micro-ondes, en fonction de leur poids moléculaires a été réalisée par

électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Leurs profils électrophorétiques sont illustrés dans la figure 35.



**Figure 35.** Profils électrophorétiques des protéines des glutens témoin et traités par Micro-ondes.

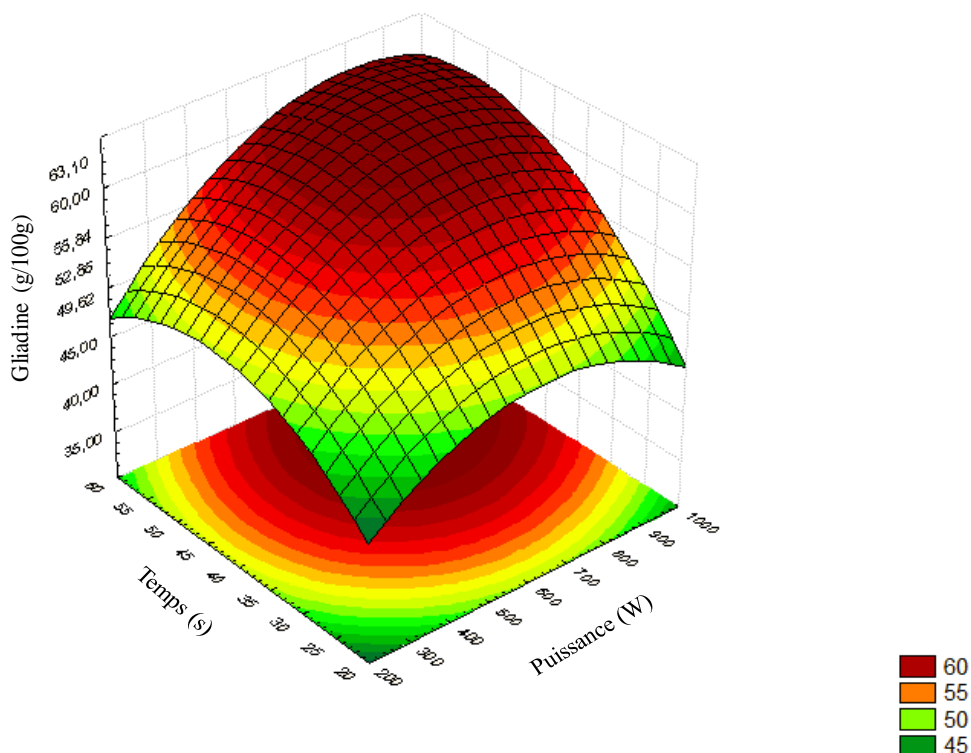
A) Profils électrophorétiques des sous unités du glutenines extraites du gluten témoin et traités par Micro-ondes réduites et alkylées, B).Profil electrophorétique de gliadines extraites du gluten témoin et traités par Micro-ondes

Ligne 1-A et ligne 2-B : marqueur de taille ; Ligne 2 (A) et Ligne 1 (B) : gluten témoin (Puissance 0, temps 0) ; ligne 3: gluten 1 (317,1W , 25,85s) ; ligne 4 : gluten 2 (882,8 W. 25,85s) ; ligne 5 : gluten 3 (317,1W, 54,14s) ; ligne 6 : gluten 4 (882,8 W,54.14s) ; ligne 7 : gluten 5 (200W, 40s) ; ligne8 : gluten 6 (1000W, 40s) ; ligne 9 : gluten 7 (600 W, 20s) ; ligne 10 : gluten 8 (600 W, 60s) ; ligne 11 : gluten 9 (600 W, 40s) ; ligne 12 : gluten 10 (600 W, 40s) ; ligne 13 : gluten 11 (600 W, 40s) ; ligne 14 : gluten 12 (600 W, 40s) ; ligne 15 : gluten 13 (600 W, 40s).

Les résultats de SDS-PAGE montrent que les gluténines et les gliadines des glutens traités par Micro-ondes ne présentent aucune différence significative entre leur profils électrophorétiques et aussi par rapport à leurs témoins. Aucune augmentation ou diminution du nombre de bandes de protéines n'a été observée. Ces résultats indiquent que la structure primaire des protéines du gluten n'est pas modifiée, ce qui signifie que le traitement Micro-ondes n'a pas hydrolysé le gluten dans les conditions testées. Nos résultats sont conformes à la littérature où il est rapporté que les rayonnements Micro-ondes ne peuvent pas détruire la structure primaire des protéines car l'énergie de la liaison chimique est bien supérieure à l'énergie quantique des Micro-ondes (Han *et al.* , 2018).

#### 4.5. Effet du traitement Micro-ondes sur l'extractibilité des protéines du gluten

En ce qui concerne l'extractibilité des protéines du gluten mesurée par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse HPLC-RP, la puissance et le temps de traitement influencent significativement la teneur en gliadines extractibles. Les deux facteurs montrent un effet linéaire et quadratique sans interaction significative entre les deux facteurs (Figure 36).



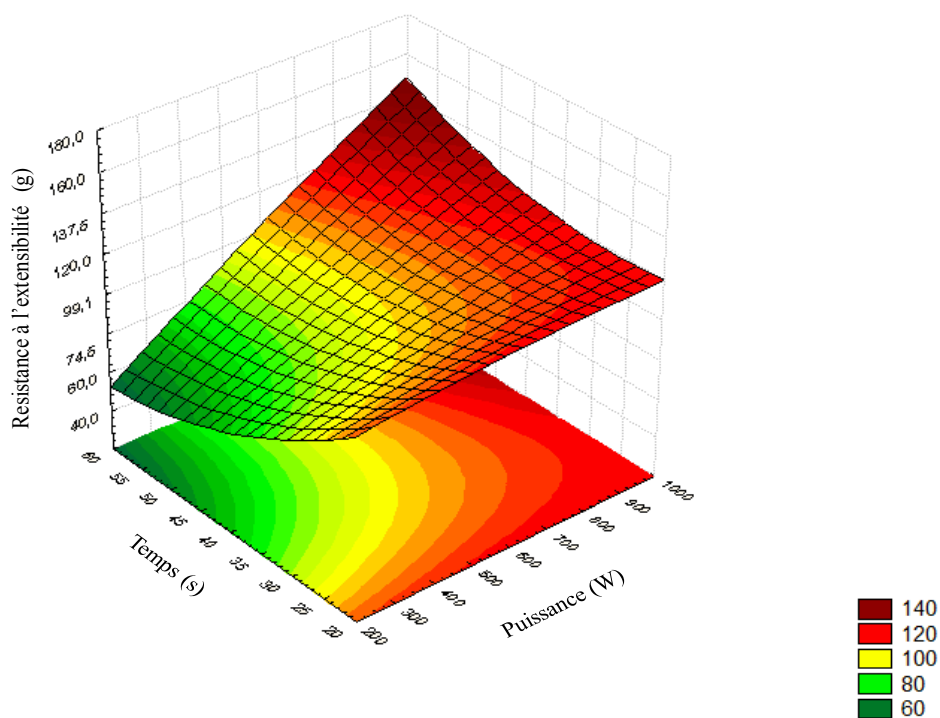
**Figure 36.** Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur l'extractibilité des gliadines.

La teneur en gliadines extractibles mesurée après traitement Micro-ondes est comprises entre  $45,39 \pm 1,41$  g/100g et  $63,63 \pm 1,55$  g/100g. Elle a atteint le maximum dans les conditions de puissance et de temps proches des valeurs maximales utilisées. En effet, les gliadines extractibles obtenus dans ces conditions sont significativement plus élevées que celle observée pour le gluten non traité qui est de  $49,97 \pm 4,42$  g/100g à l'exception du gluten 1 ( $317,1$  W,  $25,85$  s).

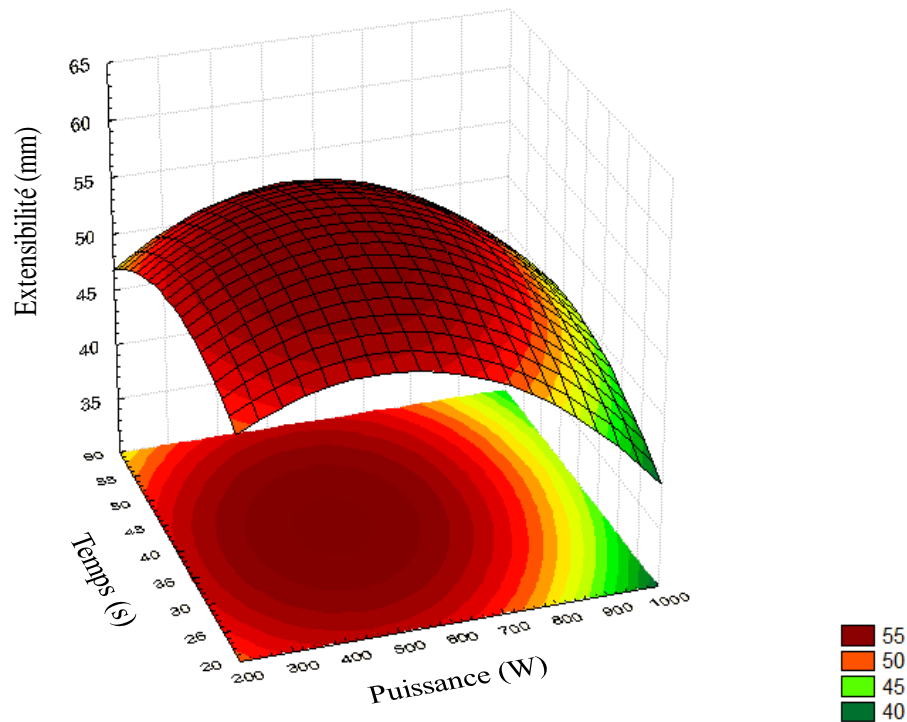
Néanmoins, le traitement microonde n'a pas affecté les gluténines extractibles c'est à dire la protéine extraite après réduction par dithiothreitol (DTT). De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les glutens traités par Micro-ondes sous différentes puissances et durées d'exposition. Le fait que l'extractibilité des gliadines est significativement modifiée sans changement de leur structure primaire suggère que des modifications de leur structure secondaire et tertiaire sont impliquées dans cette augmentation observée de l'extractibilité.

#### 4.6. Effet du traitement Micro-ondes sur les propriétés rhéologiques du gluten et les groupements thiols libres

Les figures 37 et 38 montrent l'effet du traitement Micro-ondes sur la résistance maximale à l'extension ( $R_{max}$ ) et l'extensibilité (Ext) du gluten successivement.



**Figure 37.** Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur la résistance maximale à l'extension.



**Figure 38.** Surface de réponse de l'effet du traitement Micro-ondes sur l'extensibilité totale.

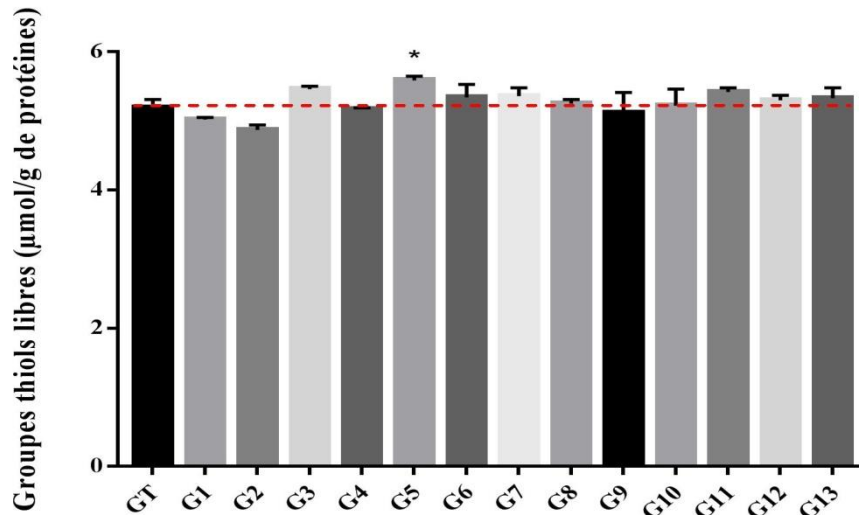
La résistance maximale à l'extension ( $R_{\max}$ ) des glutens traités par Micro-ondes est comprise entre  $64,63 \pm 0,58$  g et  $142,17 \pm 4,38$  g. Comparativement au gluten témoin,  $91,47 \pm 1,06$  g, ce traitement diminue dans certaines conditions  $R_{\max}$  alors qu'il l'augmente dans d'autres.

La puissance utilisée et le temps de traitement ont un effet linéaire significatif sur la résistance maximale à l'extension. Cependant ces deux facteurs l'influencent de manière opposée. Il a été observé une interaction significative entre les deux paramètres (Figure 37). Globalement, les valeurs maximales de la résistance maximale à l'extension ont été observées lorsque le gluten est traité aux niveaux les plus élevés de puissance et de temps d'exposition. Une corrélation significative est observée ( $r = 0,561$ ;  $p < 0,046$ ) avec la température maximale atteinte après traitement Micro-ondes. Ces résultats sont partiellement comparables à ceux rapportés par Warchalewski *et al.* (2011) qui ont révélé que le traitement du gluten par Micro-ondes augmente son module d'élasticité.

Pour l'extensibilité totale (Ext), les valeurs des glutens traités par Micro-ondes sont significativement différentes à celle du gluten témoin qui est de  $59,64 \pm 2,05$  mm. En moyenne, à l'exception du gluten 2 (882,8 W, 25,85 s) et les points centraux (600 W, 40s) l'extensibilité totale diminue. Gluten 2, traité à 882,8 W pendant 25,85, est le seul cas où

l'extensibilité augmente. Concernant la puissance et le temps utilisés, des effets linéaires et quadratiques significatifs sont observés et de même une interaction significative entre les deux facteurs (Figure 38).

Les ponts disulfures jouent un rôle fondamental dans la détermination de la structure polymérique et des propriétés fonctionnelles du gluten (Shewry *et al.*, 2002). La teneur en groupements thiols libres du gluten témoin est de  $5,19 \pm 0,12 \mu\text{mol} / \text{g}$  de protéine.



**Figure 39.** Teneurs en groupements thiols libres du gluten témoin et glutens traités par Micro-ondes.

Différences par rapport au gluten témoin \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Après traitement Micro-ondes, la teneur en groupements thiols libres varie entre  $4,87 \pm 0,07$  et  $5,59 \pm 0,07 \mu\text{mol} / \text{g}$  de protéine (Figure 39). Le gluten 3 (317,1 W, 54,14s) et le gluten 5 (200 W, 40s) présentent une quantité significativement plus élevée de groupements thiols libres alors que le gluten 2 (882,8 W, 25,85s) contient la quantité la plus faible. Les glutens 3 (317,1W, 54,14s) et 5 (200 W, 40 s) correspondent aux glutens ayant une résistance maximale à l'extension inférieure, alors que les glutens 2 (882,8 W, 25,85s) et 4 (882,8 W, 54,14s) correspondent aux valeurs supérieures de résistance maximale à l'extension. En fait, une corrélation significative négative entre la teneur en groupements thiols libres du gluten et la résistance maximale à l'extension ( $r = -0,727$ ,  $p < 0,005$ ) est constatée. Cette corrélation peut être expliquée par le fait que le clivage des liaisons disulfures intermoléculaires entraîne la dépolymérisation des protéines du gluten en diminuant le poids moléculaire et par conséquent la réduction ainsi de la résistance maximale à l'extension et l'augmentation de l'extensibilité de la pâte (Dong et Hosney,1995).



Néanmoins, la variation de la teneur en groupements thiols libres n'explique que 53% de la variation observée de la résistance maximale à l'extension lorsque le gluten est traité par Micro-ondes. Le mécanisme principal de la modification protéique par traitement Micro-ondes est que les groupes polaires de protéines peuvent absorber de l'énergie et transmettre un processus cinétique générant des radicaux libres, ce qui peut perturber diverses interactions entre les molécules protéiques, notamment les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques et hydrophobes, les liaisons hydrogènes et disulfures, modifiant par conséquent la structure secondaire et tertiaire des protéines et leur propriétés fonctionnelles (Han *et al.*, 2018).

#### **4.7. Effet du traitement Micro-ondes sur la structure secondaire**

Afin d'approfondir la compréhension des changements structuraux survenus dans les protéines du gluten après traitement Micro-ondes, en particulier en ce qui concerne sa structure secondaire, les échantillons sont analysés par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).

La déconvolution de la bande de l'amide I [1700, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ] des échantillons du gluten, témoin et traités par Micro-ondes, a permis d'analyser les principaux éléments de la structure secondaire, à savoir les intensités relatives à  $\sim 1671$  (coudes  $\beta$ ), 1657 (hélice  $\alpha$  et aléatoire), 1628 (feuillet  $\beta$ ) et 1614  $\text{cm}^{-1}$  (feuillet  $\beta$  intermoléculaire) (Wellner *et al.*, 2005).

Les intensités relatives des principaux éléments de la structure secondaire des protéines de gluten sont résumées dans le tableau 17. Les intensités des bandes sont divisées par la bande 1644  $\text{cm}^{-1}$  afin d'éviter le facteur de normalisation.

**Tableau 17.** Pourcentages des composants de la structure secondaire des glutens témoin et traités par Micro-ondes déterminés par spectroscopie FTIR.

Position de la bande (cm <sup>-1</sup> )	1671	1657	1628	1614
Structure secondaire	Coudes β	Hélices α	Feuillet β	Feuillet β intermoléculaire
Gluten témoin	0,719±0,005	0,978±0,007	1,061±0,007	0,506±0,014
G1 (317,1W, 25,85s)	0,729±0,002*	0,615±0,002*** *	0,782±0,002*****	0,289±0,004*****
G2 (882,8W, 25,85s)	0,586±0,005*****	0,815±0,008*** *	0,683±0,006*****	0,688±0,012*****
G3 (317,1W, 54,14s)	0,483±0,002*****	0,612±0,003*** *	0,674±0,003*****	0,637±0,007*****
G4 (882,8W, 54,14s)	0,674±0,006*****	0,569±0,005*** *	0,755±0,007*****	0,725±0,008*****
G5 (200W , 40s)	0,467±0,003*****	0,766±0,006*** *	0,868±0,006*****	0,395±0,009*****
G6 (1000W, 40s)	0,835±0,002*****	1,029±0,002*** *	1,166±0,003*****	0,568±0,005*****
G7 (600 W, 20s)	0,906±0,008*****	0,822±0,007*** *	1,021±0,009*****	0,884±0,011*****
G8 (600 W, 60s)	0,631±0,001*****	0,609±0,001*** *	0,754±0,001*****	0,379±0,003*****
G9 (600 W, 40s)	0,666±0,08*****	0,849±0,011*** *	0,840±0,011*****	0,838±0,017*****

Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  et \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

Les résultats montrent clairement que la structure secondaire du gluten est modifiée par le rayonnement Micro-ondes. Les structures hélices  $\alpha$  (bande à 1657 cm<sup>-1</sup>) sont significativement affectées par le traitement Micro-ondes. En fait, ces structures sont associées aux régions N- et C- terminales des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) qui contiennent des résidus de cystéine (Li *et al.* , 2005). Considérant que le chauffage généré par le traitement Micro-ondes favorise les réactions d'échange sulfhydryle-disulfure, la diminution de la quantité de ces structures secondaires peut indiquer différent arrangement des liaisons disulfures dans le gluten sous Micro-ondes. En outre, l'intensité relative des structures de coudes  $\beta$  (1671 cm<sup>-1</sup>) est aussi affectée par le traitement Micro-ondes mais dans ce cas, l'effet semble être plus aléatoire entre les échantillons avec différents puissances et temps d'exposition. Il a été proposé que les structures coudes  $\beta$  de SG-HPM s'organisent pour donner une structure régulière en  $\beta$ -spirale (Shewry *et al.* , 2002). Ainsi, la diminution ou l'augmentation de l'intensité relative des structures coudes  $\beta$  vérifiée pour les échantillons traités par Micro-ondes par rapport au témoin indique des modifications potentielles de la structure en spirale  $\beta$  et même de sa proportion (Wellner *et al.* , 2005).

Considérant l'importance de cette structure comme elle a été décrite, son association avec le comportement élastique du gluten (Tatham *et al.* ,1985 ; Humphris *et al.* , 2000), nous pouvons énoncer que, en plus des modifications favorisées par le traitement Micro-ondes au niveau de la structure tertiaire imposée par les liaisons disulfures, les modifications de la structure secondaire des protéines du gluten peuvent également jouer un rôle extrêmement important dans la détermination des propriétés rhéologiques et fonctionnelles du gluten traité par Micro-ondes.

#### **4.8. Effet du traitement Micro-ondes sur les caractéristiques macromoléculaires des polymères**

La modification des protéines du gluten induite par ces rayonnements est également confirmée par le changement d'abondance et des caractéristiques moléculaires des polymères, déterminés par Fractionnement Par Flux De Force Asymétrique (AF4) (Tableau 18). Comme nous pouvons le constater, le traitement du gluten par Micro-ondes induit des changements de la distribution de la masse moléculaire des agrégats polymériques, qui ont été principalement évaluées par la Masse molaire moyenne en poids ( $M_w$ ), la dispersité ( $M_w / M_n$ ) et le pourcentage de fraction massique agrégée.

**Tableau 18.** Caractéristiques des polymères des glutens témoin et traités par Micro-ondes.

Echantillon	Mw (kDa)	Ip (Mw/Mn)	Pourcentage de fraction massique agrégée (%)
Gluten témoin	32862,23 ± 3044,02	4,11 ± 0,10	16,99 ± 0,82
G1 (317,1W, 25,85s)	30691,00 ± 1635,65	4,09 ± 0,09	15,82±0,93
G2 (882,8W, 25,85s)	27536,10 ± 2029,01**	3,99 ± 0,31	19,53±0,94*
G3 (317,1W, 54,14s)	34425,23 ± 2250,51	4,63 ± 0,24*	10,84 ± 0,92***
G4 (882,8W, 54,14s)	27705,30 ± 1535,58**	4,10 ± 0,34	18,18 ± 0,70
G5 (200W, 40s)	34461,80 ± 923,17	4,52 ± 0,19	15,50 ± 1,57
G6 (1000W, 40s)	37460,15 ± 1269,25*	4,74 ± 0,05**	13,28 ± 1,43***
G7 (600 W, 20s)	39103,10 ± 4126,69**	5,01 ± 0,22***	14,37 ± 1,71*
G8 (600 W, 60s)	30784,25 ± 2922,95	4,36 ± 0,24	10,05 ± 0,55***
G9 (600 W, 40s)	35094,50 ± 2715,76	4,68 ± 0,16*	13,01 ± 2,26***
G10 (600 W, 40s)	40768,00 ± 112,10***	5,13 ± 0,02***	14,83 ± 0,84*
G11 (600 W, 40s)	37292,60 ± 1794,76*	4,86 ± 0,47**	16,37 ± 0,85
G12 (600 W, 40s)	41044,17 ± 1375,40***	5,14 ± 0,42***	13,48 ± 0,63***
G13 (600 W, 40s)	33338,85 ± 2830,05	4,51 ± 0,24	14,42±0,68*

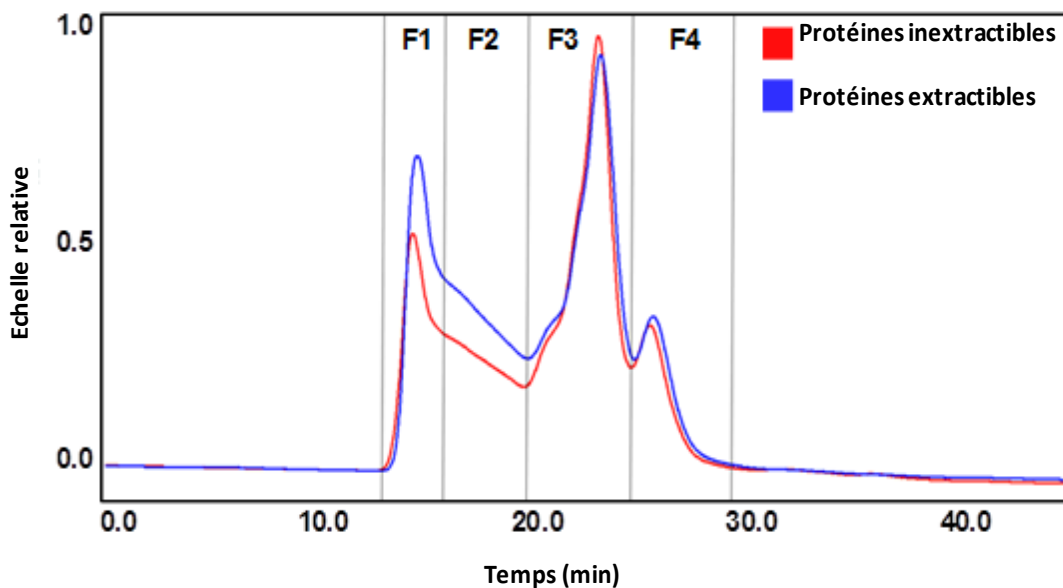
Mn : le rapport de la masse de l'échantillon sur le nombre de chaînes ; Mw : Masse molaire moyenne en poids ;  
Ip (Mw/Mn) : Indice polydispersité

Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$  , \*\* :  $p < 0,01$  , \*\*\* :  $p < 0,001$  , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

La masse molaire moyenne en poids et la dispersité des polymères agrégés ont augmenté de manière significative pour la plupart des glutens traités par Micro-ondes, les glutens 2, 4, 6, 7, 10, 11 et 12, et 3, 6, 7, 9, 10, 11 et 12, respectivement, également de plus en plus pour les deux paramètres. Les changements observés dans la distribution moléculaire des polymères de gluténines s'accompagnent d'une diminution significative du pourcentage de fraction massique agrégée, ce qui montre la perturbation des interactions faibles (telles que les interactions hydrophobes, de van der Waals et d'hydrogène) entre les polymères agrégés. De plus, compte tenu de l'absence des effets significatifs sur les groupements thiols libres, les modifications de la Masse molaire moyenne en poids (Mw) ne sont pas dues à la polymérisation et / ou à la dépolymérisation de la glutenine mais à la désagrégation des protéines.

#### 4.9. Effet du traitement Micro-ondes sur la solubilité des protéines du gluten dans le SDS

Afin de mieux comprendre l'effet du traitement Micro-ondes sur la fonctionnalité du gluten et les caractéristiques macromoléculaires des protéines, la solubilité des protéines dans le SDS a été étudiée à l'aide de la chromatographie d'exclusion de taille (SEC). Des paramètres tels que UPP / EPP, UPP / TPP et Glii / Glis, qui jouent un rôle clé dans la formation des agrégats polymériques et dans l'arrangement du réseau du gluten, ont été déterminés (Figure 40 et tableau 19).



**Figure 40.** Profil de chromatographie d'exclusion de taille du gluten témoin à 214 nm.

Les lignes bleue et rouge indiquent les extraits protéiques solubles et insolubles dans le SDS à 2% respectivement. Le profil d'éluion est divisé en quatre principaux pics qui correspondent aux protéines polymériques de gluténines (F1s+F2s), gliadines (F3) et protéines fonctionnelles (F4)

**Tableau 19.** Extractibilité des protéines du gluten après traitement Micro-ondes.

Echantillon	UPP/EPP	UPP/TPP (%)	Glii/Glis
GT (0 W, 0s)	1,20±0,18	54,26±3,74	0,94±0,13
G1 (317,1W, 25,85s)	0,81±0,02***	44,83±0,57**	0,59±0,05***
G2 (882,8W, 25,85s)	0,64±0,17****	38,45±6,26****	0,35±0,18****
G3 (317,1W, 54,14s)	0,69±0,12****	40,49±4,2****	0,46±0,11****
G4 (882,8W, 54,14s)	0,65±0,19****	38,61±7,17****	0,34±0,19****
G5 (200W, 40s)	0,97±0,03*	49,14±0,7	0,72±0,08*
G6 (1000W, 40s)	0,65±0,03****	39,39±1,12****	0,39±0,03****
G7 (600 W, 20s)	1,14±0,13	53,02±2,93	0,81±0,16
G8 (600 W, 60s)	1,09±0,00	52,13±2,93	0,82±0,01
G9 (600 W, 40s)	1,05±0,05	51,25±1,15	0,83±0,08
G10 (600 W, 40s)	0,89±0,13**	46,99±3,53*	0,56±0,15***
G11 (600 W, 40s)	0,87±0,07**	46,58±1,89*	0,62±0,06**
G12 (600 W, 40s)	1,1±0,00	52,45±0,08	0,81±0,02
G13 (600 W, 40s)	1,13±0,14	52,88±3,11	0,76±0,06

UPP: Protéine Polyémrique non extractible, EPP : Protéine Polymérique Extractible, TPP : Protéine Polymérique Totale, Glii: Gliadine non extractible, Glis : Gliadine extractible

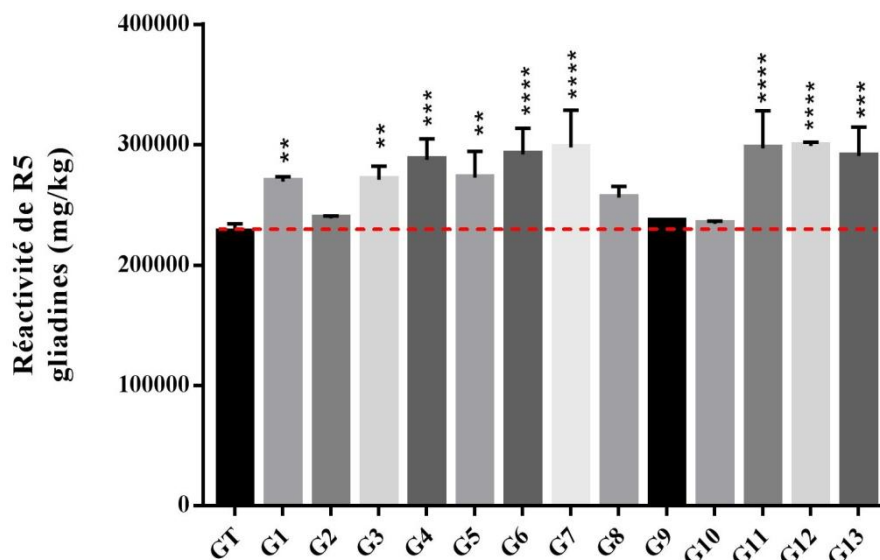
Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  et \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

Le traitement Micro-ondes a changé de manière significative la solubilité des protéines du gluten dans le SDS à 2%. Les paramètres UPP / EPP, UPP / TPP et Glii / Glis ont diminué pour tous les échantillons traités par Micro-ondes comparativement au témoin. Les UPP / EPP ont diminué de 1,20, pour le gluten témoin, à 0,65 pour le gluten 6 traité par Micro-ondes (1000W, 40s) où la température la plus élevée a été atteinte (77,80 °C). Les UPP / TPP (%) ont diminué de 54,26 % à 39,39 % pour le gluten témoin et le gluten 6 traité par Micro-ondes (1000W, 40s), respectivement. Ces changements sont dus au phénomène de désagrégation des agrégats polymériques. La fraction la plus touchée était la protéine polymérique non extractible, appelée la fraction 2 de la gluténine non extractible (Tableau 19 et figure 40), au même temps, le traitement Micro-ondes a modifié de manière significative le ratio gliadines non extractibles / gliadines extractibles (Glii / Glis). Comme prévu, la solubilité de la gliadine a augmenté de manière significative avec le traitement. Le rapport Glii / Glis a diminué de

0,94 à 0,39 pour le gluten non traité et le gluten 6 traité par Micro-ondes (1000W, 40s) successivement. Ces diminutions signifient que les interactions entre la gliadine et les agrégats polymériques ont été perturbées, ce qui a entraîné des modifications de la distribution de la masse moléculaire des agrégats polymériques.

#### 4.10. Effet du traitement Micro-ondes sur les épitopes potentiellement toxiques du gluten

Les effets du traitement Micro-ondes sur la quantité des épitopes potentiellement toxiques pour la maladie cœliaque libérés après une digestion gastrique et intestinale *in vitro* ont été évalués et rapportés dans la figure 41.



**Figure 41.** Immunoréactivité de l'anticorps R5 avec glutens traités par Micro-ondes et gluten témoin mesurée après digestion peptique et trypsique.

Différences par rapport au gluten témoin \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  et \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

Aucun effet linéaire, quadratique et d'interaction significatifs des facteurs analysés n'a été observé (Tableau 16). Néanmoins, il faut noter qu'aucun échantillon traité par Micro-ondes ne présente en moyenne une teneur en épitopes toxiques inférieure à celle de témoin. Les résultats varient de  $227,5 \pm 7,3$  g / kg pour le gluten témoin à  $298,8 \pm 3,5$  g / kg pour le gluten 12 traité par Micro-ondes (600W, 40s) (Figure 41). De ce point de vue, il est bien évident que, malgré les différences significatives observées dans la structure secondaire et les caractéristiques macromoléculaires des polymères, le traitement Micro-ondes ne peut pas

diminuer la quantité des épitopes potentiellement toxiques pour la maladie cœliaque libérée après une digestion gastrique et intestinale simulée.

Ces résultats sont partiellement conformes à ceux de Leszczynska *et al.* (2003) et Gianfrani *et al.* (2017) qui ont observé que le traitement Micro-ondes n'a pas réduit l'immunogénicité des gliadines de préparations commerciales et de graines de *Triticum durum* et de *Triticum aestivum* imbibées respectivement. Néanmoins, Gianfrani *et al.*, (2017) ont observé une diminution de la réactivité de l'anticorps R5 lorsque les protéines alcool-solubles non digérées obtenues à partir de graines traitées par Micro-ondes analysées par dosage ELISA R5-sandwich, ce qui s'oppose avec les résultats de test ELISA basée sur l'anticorps G12, de la protéomique basée sur la spectrométrie de masse et de test *in vitro* sur les cellules T des malades cœliaques qui ne présentent aucune différence significative de toxicité entre les graines traitées et non traitées par Micro-ondes. Dans ce travail, nous avons utilisé les digestats peptiques-trypsiques des glutens traités par Micro-ondes et le test ELISA R5 compétitif pour mesurer leur immunotoxicité potentielle (Osman *et al.*, 2001 ; Kahlenberg *et al.*, 2006) et nous avons observé une augmentation moyenne de la toxicité du gluten (+ 20%) après le traitement Micro-ondes. Par contre, Lamacchia *et al.* (2016) ont signalé que le traitement Micro-ondes de graines de blé, mélange de blé tendre et de blé dur, à 1000 W pendant 2 min réduisait la réactivité croisée avec l'anticorps R5 de 99%. Ce qui est conforme avec les résultats de Gianfrani *et al.*, (2017) mentionnés précédemment lors de l'utilisation de l'anticorps R5 sans protéolyse préalable. Les deux résultats semblent clairement indiquer que la mesure de l'immunogénicité potentielle du gluten par des tests d'anticorps doivent être effectuée avec du matériel préalablement hydrolysé. L'augmentation de l'immunotoxicité cœliaque observée pour le gluten traité par Micro-ondes (maximum 31%) peut être liée aux changements observés dans les structures secondaire et tertiaire, notamment le phénomène de désagrégation des polymères du gluten qui peut rendre une structure protéique du gluten plus accessible aux protéases, ce qui peut à son tour se traduire par une augmentation de la quantité de peptides libérés après digestion avec des propriétés immunogéniques.



*Conclusion générale et  
perspectives*

## **Conclusion générale et perspectives**

Cette étude visait à déterminer les effets de la Détente Instantanée Contrôlée ainsi que les micro-ondes sur les protéines du gluten de blé dans le but de diminuer ou supprimer totalement leurs immunoréactivités pour améliorer la qualité de vie des malades cœliaques. Les propriétés structurales et fonctionnelles ont été également étudiées pour s'assurer qu'elles n'étaient pas perdues.

Les résultats de la DIC montrent que ce traitement donne un aspect rigide à la poudre du gluten de blé en raison de l'augmentation de la proportion des structures  $\beta$ . Par ailleurs, la dénaturation résultant de la perte de structure secondaire et la formation de liaisons disulfures ont réduit la solubilité, la capacité émulsifiante et la capacité moussante des protéines du gluten de blé. Cependant, le traitement DIC n'a pas affecté la structure primaire. Les résultats de test ELISA indirect ont montré que le traitement DIC augmente globalement l'immunoréactivité du gluten malgré la diversité des réponses des malades cœliaques. Ce résultat a été confirmé par les résultats du test ELISA R5 compétitif qui montrent que la quantité des épitopes des glutens et des pains augmente après traitement DIC.

Concernant le traitement micro-ondes, le phénomène de désagrégation des protéines du gluten observé après traitement a causé l'augmentation de l'immunoréactivité. De plus, la structure secondaire est affectée par ce traitement à l'inverse de la structure primaire. Néanmoins, du point de vue fonctionnel, le traitement micro-ondes peut être un traitement efficace pour augmenter la résistance à l'extensibilité dans une combinaison appropriée de temps de traitement et de niveau de puissance et peut être utilisé avantageusement pour la production du gluten vital. La diminution de la teneur en groupements thiols libres et le réarrangement des liaisons disulfures ainsi que l'augmentation de l'abondance des polymères après traitement micro-ondes ont contribué à l'amélioration de la résistance à l'extensibilité. Par ailleurs les réactions d'échange thiols libres-ponts disulfures, les changements dans la structure secondaire des protéines du gluten sont également importantes pour expliquer cet effet.

Les deux traitements physiques étudiés ne sont pas efficaces pour la réduction de l'immunoréactivité des protéines du gluten. Néanmoins, ces résultats peuvent être exploités dans le futur pour détoxifier le gluten, notamment le traitement micro-ondes qui a amélioré les propriétés rhéologiques des protéines du gluten et en même temps augmente l'accessibilité aux épitopes. Il serait intéressant de :

- traiter la poudre du gluten par le traitement micro-ondes et un traitement enzymatique afin de modifier les épitopes toxiques démasqués et par conséquent inhiber leur reconnaissance par les anticorps antigliadine.
- traiter la poudre du gluten et autres matières premières, farine de blé, graines de blé, par autres traitements physiques comme les ultrasons.

*Références  
bibliographiques*

- AACC.** **Approved methods of the American association of cereal chemists.** (2000). 11th ed. AACC International: St. Paul.
- Abuaf, N., Adotévi, O., Amé-Thomas, P., André, C., Arnulf, B., Aucouturier, P., ... & Bellet, D.** (2018). Immunologie fondamentale et immunopathologie: Enseignements thématique et intégré-Tissu lymphoïde et sanguin/Immunopathologie et immuno-intervention. Elsevier Health Sciences.344p.
- AFNOR.** (1991). In recueil des normes françaises, contrôle de la qualité des produits alimentaires, Céréales et produits céréaliers, AFNOR/DGCCRF, 3ème édition, Paris, 360p.
- Agyare, K. K., Addo, K., & Xiong, Y. L.** (2009). Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 72-81.
- Akkouche, Z., Aissat, L., & Madani, K.** (2012, September). Effect of heat on egg white proteins. In *International Conference on Applied Life Sciences*. IntechOpen. 407-413.
- Alais, C., Linden, G., & Miclo, L.** (2008). Biochimie alimentaire: IUT, licence, écoles d'ingénieurs. Dunod.260 p.
- Albitar, N.** (2010). Etude comparative des procédés de séchage couplés à la texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC, en termes de cinétique et de qualité nutritionnelle. Applications à la valorisation des déchets agro-industriels. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle. 191 p.
- Alimentarius, C.** (1987). Codex Standard for wheat protein products including wheat gluten. *CODEX STAN*, 163.
- Allaf, K., Mounir, S., & Allaf, T.** (2012). Swell-drying: séchage et texturation par DIC des végétaux.
- Anderson, R. P., & Wieser, H.** (2006). Medical applications of gluten-composition knowledge. Gliadin and glutenin. The unique balance of wheat quality. *AACC International Press, St Paul*, 387-409.
- Angellier-Coussy, H., Guillard, V., Guillaume, C., & Gontard, N.** (2011). Wheat gluten (WG)-based materials for food packaging. In *Multifunctional and nanoreinforced polymers for food packaging* (pp. 649-668). Woodhead Publishing.
- Arnulf, B., Batteux, F., Bene, M. & al. ,** (2018). Immunopathologie: Réussir les ECNi. Elsevier Health Sciences.400 p.
- Atwell, W. A.** (2001). An overview of wheat development, cultivation, and production. *Cereal foods world*, 46(2), 59-62.
- Babiker, E. F. E., Fujisawa, N., Matsudomi, N., & Kato, A.** (1996). Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by

- microbial transglutaminase treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(12), 3746-3750.
- Badje, S. D., Soro, D., Niamketchi, G. L., & Koffi, E. K.** (2019). Étude des comportements chimiques, fonctionnels et rhéologiques de mélanges de farines de blé (*Triticum aestivum*), amande de cajou. *Afrique Science*, 15(6), 143-155.
- Battais, F., Richard, C., & Leduc, V.** (2007). Les allergènes du grain de blé. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 47(3), 171-174.
- Ben Amor, B.** (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC. Thèse de doctorat. *Université de La Rochelle, France*. 185 p.
- Berk, Z.** (1993). Technologie de production de farines alimentaires et de produits protéiques issus du soja (Vol. 97). *Food & Agriculture Org*. 192 p.
- Bethune, M. T., Strop, P., Tang, Y., Sollid, L. M., & Khosla, C.** (2006). Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chemistry & biology*, 13(6), 637-647.
- Ménard, G., & Boudreau, A.** (1992). Le blé. *SAINTE-FOY (Québec) Canada*, 2.
- Bonilla, J. C., Erturk, M. Y., & Kokini, J. L.** (2020). Understanding the role of gluten subunits (LMW, HMW glutenins and gliadin) in the networking behavior of a weak soft wheat dough and a strong semolina wheat flour dough and the relationship with linear and non-linear rheology. *Food Hydrocolloids*, 106002.
- Boughellout, H., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J. M., Haertle, T., Mounir, S., Allaf, K. & Zidoune, M. N.** (2015). Effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on milk protein's immunoreactivity. *Food and agricultural immunology*, 26(1), 71-81.
- Bouraoui, M., Richard, P., & Durance, T.** (1994). Microwave and convective drying of potato slices. *Journal of Food Process Engineering*, 17(3), 353-363.
- Bourekoua, H., Benatallah, L., Zidoune, M. N., & Rosell, C. M.** (2016). Developing gluten free bakery improvers by hydrothermal treatment of rice and corn flours. *LWT*, 73, 342-350.
- Bourekoua, H., Różyło, R., Benatallah, L., Wójtowicz, A., Łysiak, G., Zidoune, M. N., & Sujak, A.** (2018). Characteristics of gluten-free bread: quality improvement by the addition of starches/hydrocolloids and their combinations using a definitive screening design. *European Food Research and Technology*, 244(2), 345-354.
- Bourekoua, H., Gawlik-Dziki, U., Różyło, R., Zidoune, M. N., & Dziki, D.** (2020). Acerola fruit as a natural antioxidant ingredient for gluten-free bread: An approach to improve bread quality. *Food Science and Technology International*, 1082013220929152.

- Bouteloup, C.** (2016). Les pathologies digestives liées au blé ou au gluten: certitudes et doutes. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51(5), 248-258.
- Branger, A.** (2007). Microbiochimie et alimentation. Educagri Editions.343p.
- Cabanillas, B.** (2019). Gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-16.
- Cabrera-Chávez, F., Rouzaud-Sáñez, O., Sotelo-Cruz, N., & Calderón de la Barca, A. M.** (2008). Transglutaminase treatment of wheat and maize prolamins of bread increases the serum IgA reactivity of celiac disease patients. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(4), 1387-1391.
- Cabrera-Chávez, F., Islas-Rubio, A. R., Rouzaud-Sáñez, O., Sotelo-Cruz, N., & de la Barca, A. M. C.** (2010). Modification of gluten by methionine binding to prepare wheat bread with reduced reactivity to serum IgA of celiac disease patients. *Journal of cereal science*, 52(2), 310-313.
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C., & Fasano, A.** (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC medicine*, 17(1), 1-20.
- Caessens, P. W., Visser, S., Gruppen, H., & Voragen, A. G.** (1999).  $\beta$ -Lactoglobulin Hydrolysis. 1. Peptide Composition and Functional Properties of Hydrolysates Obtained by the Action of Plasmin, Trypsin, and Staphylococcus aureus V8 Protease. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(8), 2973-2979.
- Capriles, V. D., dos Santos, F. G., & Arêas, J. A. G.** (2016). Gluten-free breadmaking: Improving nutritional and bioactive compounds. *Journal of Cereal Science*, 67, 83-91.
- Carceller, J. L., & Aussenac, T.** (1999). Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats: role of the desiccation phase. *Functional Plant Biology*, 26(4), 301-310.
- Casella, M. L., & Whitaker, J. R.** (1990). Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties. *Journal of food biochemistry*, 14(6), 453-475.
- Chan, K. Y., & Wasserman, B. P.** (1993). Direct colorimetric assay of free thiol groups and disulfide bonds in suspensions of solubilized and particulate cereal proteins. *Cereal Chemistry*, 70, 22-22.
- Chene, A.** (2001). La farine. *Journal de l'ADRIANOR*, 26, 3-8.
- Ciacchi, C., Ciclitira, P., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Ludvigsson, J. F., McGough, N., & Swift, G. L.** (2015). The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United European gastroenterology journal*, 3(2), 121-135.
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., & Corazza, G. R.** (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 140(3), 408-416.
- Cornell, H. J.** (2012). The chemistry and biochemistry of wheat In Breadmaking (pp. 35 -76), 2<sup>nd</sup> Ed. Woodhead Publishing.

- Cuadrado, C., Cabanillas, B., Pedrosa, M. M., Muzquiz, M., Haddad, J., Allaf, K., Rodriguez, J., Crespo, J-F & Burbano, C.** (2011). Effect of instant controlled pressure drop on IgE antibody reactivity to peanut, lentil, chickpea and soybean proteins. *International archives of allergy and immunology*, 156(4), 397-404.
- Dacosta, Y.** (1986). Le gluten de blé et ses applications. Ed tec & doc ; APRIA, paris, 1-63.
- Dagnelie, P.** (2000). La planification des expériences: choix des traitements et dispositif expérimental. *Journal de la société française de statistique*, 141(1-2), 5-29.
- Datta, A. K.** (2001). Handbook of microwave technology for food application. CRC Press.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B.** (2012). Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products. *Annual review of food science and technology*, 3, 469-492.
- Del Frate, R., & Stephan, C.** (2005). Mieux Connaitre La Farine : Spéciale Analyses, Les Nouvelles De La Boulangerie Pâtisserie. Supplément Technique INPB n° 85. Ed . SOTAL.
- Di Sabatino, A., & Corazza, G. R.** (2009). Coeliac disease. *The Lancet*, 373(9673), 1480-1493.
- Dib, A., Kasprzak, K., Wójtowicz, A., Benatallah, L., Waksmundzka-Hajnos, M., Zidoune, M. N., Oniszczuk, T., Karabula-Juchnowicz, H., & Oniszczuk, A.** (2018). The effect of pomegranate seed powder addition on radical scavenging activity determined by TLC–DPPH test and selected properties of gluten-free pasta. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 41(6), 364-372.
- Dib, A., Wójtowicz, A., Benatallah, L., Zidoune, M. N., Mitrus, M., & Sujak, A.** (2018). Optimization of rice-field bean gluten-free pasta improved by the addition of hydrothermally treated rice flour. *Italian Journal of Food Science*, 30(2).
- Diop, P. E. H., & Kaeckenbeeck, A.** (1994). *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales*. John Libbey Eurotext Ed. 318 p.
- Diraman, H.** (2010). Effect of microwaves on technological and rheological properties of suni-bug (*Eurygaster spp*) damaged and undamaged wheat flour. *Food science and technology research*, 16(4), 313-318.
- Djuikom Noutsu, C. P.** (2012). Valorisation des fractions de la production d'éthanol de maïs en bioplastique. Doctoral dissertation, École de technologie supérieure. 76 p.
- Dong, W., & Hoseney, R. C.** (1995). Effects of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheological properties. *Cereal chemistry*, 72(1), 58-63.
- Dubreil, L., Meliande, S., Chiron, H., Compoint, J. P., Quillien, L., Branlard, G. and Marion, D.** (1998). Effect of puroindolines on the bread-making properties of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 75 : 222-229.



- Durand, G., & Beaudeau, J. L.** (2011). *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*. Lavoisier.
- Fallang, L. E., Bergseng, E., Hotta, K., Berg-Larsen, A., Kim, C. Y., & Sollid, L. M.** (2009). Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2. 5 or HLA-DQ2. 2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nature immunology*, *10*(10), 1096.
- FAO.** (1995). Norme codex pour la semoule et la farine de blé dur. CODEX STAN 178-1991, Révision 1995, 3 p.
- Farrell, R. J., & Kelly, C. P.** (2002). Celiac sprue. *New England Journal of Medicine*, *346*(3), 180-188.
- Feillet, P.** (2000). Le grain de blé: composition et utilisation. Quae Ed. 308 p.
- Fennema, O. R.** (1996). Food Chemistry, 3<sup>ème</sup> Edition. 1088 p.
- Francavilla, R., Cristofori, F., Castellaneta, S., Polloni, C., Albano, V., Dellatte, S., Indrio, F., Cavallo, L., & Catassi, C.** (2014). Clinical, serologic, and histologic features of gluten sensitivity in children. *The Journal of pediatrics*, *164*(3), 463-467.
- Gardiner, W. P., & Gettinby, G.** (1998). Response Surface Methods In *Experimental design techniques in statistical practice: A practical software-based approach*. (pp. 322-354) .Elsevier.
- Gass, J., Vora, H., Bethune, M. T., Gray, G. M., & Khosla, C.** (2006). Effect of barley endoprotease EP-B2 on gluten digestion in the intact rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *318*(3), 1178-1186.
- Georget, D. M., & Belton, P. S.** (2006). Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*, *7*(2), 469-475.
- Gianfrani, C., Siciliano, R. A., Facchiano, A. M., Camarca, A., Mazzeo, M. F., Costantini, S., M.Salvati, V., Maurano, F., Mazzarella, G., Iaquinto, G., & Bergamo, P.** (2007). Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*, *133*(3), 780-789.
- Gianfrani, C., Mamone, G., La Gatta, B., Camarca, A., Di Stasio, L., Maurano, F., Picascia, S., Capozzi, V., Perna, G., Picariello, G., & Luccia, A.** (2017). Microwave-based treatments of wheat kernels do not abolish gluten epitopes implicated in celiac disease. *Food and Chemical Toxicology*, *101*, 105-113.
- Godon, B., & Willm, C.** (1991). Les industries de première transformation des céréales.
- Godon, B., & Guinet, R.** (1994). La panification française. *Technique & documentation*, 521.
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A.** (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in food science & technology*, *16*(1-3), 12-30.

- Gozé, P., Rhazi, L., Lakhal, L., Jacolot, P., Pauss, A., & Aussenac, T.** (2017). Effects of ozone treatment on the molecular properties of wheat grain proteins. *Journal of cereal science*, 75, 243-251.
- Grandvoinet, P., & Pratz, B.** (1994). Les ingrédients des pâtes. Farines et mixes. In *La panification française*. Lavoisier Tec and Doc Paris.
- Granato, D., & de Araújo Calado, V. M.** (2014). The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. *Mathematical and statistical methods in food science and technology*, 1, 1-18.
- Green, P. H., & Cellier, C.** (2007). Celiac disease. *New england journal of medicine*, 357(17), 1731-1743.
- Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., & Hofmann, T.** (2004). Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4002-4007.
- Guerrieri, N., Enrica Alberti, V. E. R. A., & Cerletti, P.** (1996). Use of Spectroscopic and Fluorescence Techniques to Assess. *Cereal Chemistry*, 73(3), 368-374.
- Guerrieri, N., & Cavaletto, M.** (2018). Cereals proteins, In *Proteins in Food Processing* .2<sup>nd</sup> Ed.. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 223-244.
- Guez, S., Masson, H., Attout, H., & Seriès, C.** (2004). Prise en charge clinique d'une allergie alimentaire (AA). *Nutrition clinique et métabolisme*, 18(1), 20-24.
- Guillamón, E., Burbano, C., Cuadrado, C., Muzquiz, M., Pedrosa, M. M., Sánchez, M., Cabanillas, B., Crespo, J. F., Rodriguez, J., Haddad, J., & Allaf, K.** (2008). Effect of an instantaneous controlled pressure drop on in vitro allergenicity to lupins (*Lupinus albus* var Multolupa). *International archives of allergy and immunology*, 145(1), 9-14.
- Guinet, R., & Godon, B.** (1994). *La panification française* (pp. 521-p). Lavoisier.
- Gupta, R. B., Khan, K., & Macritchie, F.** (1993). Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*, 18(1), 23-41.
- Gutierrez-Achury, J., Coutinho de Almeida, R., & Wijmenga, C.** (2011). Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. *Journal of internal medicine*, 269(6), 591-603.
- Haddad, J., Louka, N., Gadouleau, M., Juhel, F., & Allaf, K.** (2001). Application du nouveau procédé de séchage/texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC aux poissons: Impact sur les caractéristiques physico-chimiques du produit fini. *Sciences des aliments*, 21(5), 481-498.
- Hadjivassiliou, M., Sanders, D. S., Woodroffe, N., Williamson, C., & Grünewald, R. A.** (2008). Gluten ataxia. *The Cerebellum*, 7(3), 494.

- Hajos, G., Gelencser, E., Pusztai, A., Grant, G., Sakhri, M., & Bardocz, S.** (1995). Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 165-170.
- Hall, G. M.** (Ed.). (1996). *Methods of testing protein functionality*. Springer Science & Business Media. 266p.
- Han, Z., Cai, M. J., Cheng, J. H., & Sun, D. W.** (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review. *Trends in food science & technology*, 75, 1-9.
- Henderson, K. N., Tye-Din, J. A., Reid, H. H., Chen, Z., Borg, N. A., Beissbarth, T., Tahtham, A., Mannering, S. I., Purcell, A. W., Dudek, N. L., van Heel, D., McCluskey, J., Rossjohn, J., & Anderson, R.** (2007). A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity*, 27(1), 23-34.
- Humphris, A. D., McMaster, T. J., Miles, M. J., Gilbert, S. M., Shewry, P. R., & Tatham, A. S.** (2000). Atomic force microscopy (AFM) study of interactions of HMW subunits of wheat glutenin. *Cereal Chemistry*, 77(2), 107-110.
- Islam, S., Zhao, Y., She, M., Yu, Z., & Ma, W.** (2019). Wheat gluten protein and its impacts on wheat processing quality. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 6(3).
- Jansens, K. J., Lagrain, B., Rombouts, I., Brijs, K., Smet, M., & Delcour, J. A.** (2011). Effect of temperature, time and wheat gluten moisture content on wheat gluten network formation during thermomolding. *Journal of cereal science*, 54(3), 434-441.
- Jericho, H., & Guandalini, S.** (2018). Celiac Disease. *Current Pediatrics Reports*, 6(1), 40-49.
- JORA.** (1991). *Journal Officiel de la République Algérienne. Collections Statistiques N° 692.*
- Joubrane, K., & Machlab, H.** (2003). L'azote sur la qualité du blé tendre au liban (*Triticum aestivum*). *Lebanese Science Journal*, 4(1), 25.
- Juhász, A., Belova, T., Florides, C. G., Maulis, C., Fischer, I., Gell, G., Birinyi, Z., Ong, J., Keeble-Gagnère, G., Maharajan, A., Ma, W., Gibson, P., Jia, J., Lang, D., Mayer, K. F. X., Spannagl, M., International Wheat Genome Sequencing Consortium, Tye-Din, J. A., Appels, R., & Olsen O-A.** (2018). Genome mapping of seed-borne allergens and immunoresponsive proteins in wheat. *Science advances*, 4(8), eaar8602.
- Kahlenberg, F., Sanchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalova, H., Méndez, E., & Mothes, T.** (2006). Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research and Technology*, 222(1-2), 78-82.
- Kato, A., Shimokawa, K., & Kobayashi, K.** (1991). Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(6), 1053-1056.
- Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S.** (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.

- Kieffer, R., Schurer, F., Köhler, P., & Wieser, H.** (2007). Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 285-292.
- Kingston, H. M., & Haswell, S. J.** (1997). *Microwave-enhanced chemistry*. American Chemical Society.
- Kitissou, P.** (1995). Un nouveau paramètre alvéographique: l'indice d'élasticité (Ie). *Industries des céréales*, 9-9.
- Koehler, P., Wieser, H., & Konitzer, K. (Eds.).** (2014). Celiac disease and gluten: multidisciplinary challenges and opportunities. *Academic Press*. 244 p.
- Krull, L. H., & Wall, J. S.** (1966). Synthetic polypeptides containing side-chain amide groups. Water-soluble polymers. *Biochemistry*, 5(5), 1521-1527.
- Kwak, J. H., Kim, K. B. W. R., Lee, C. J., Kim, M. J., Kim, D. H., SunWoo, C., Jung, S. A, Kim, H. J, Choi, J. S, Kim, S. W, & Ahn, D. H.** (2012). Effects of autoclave and microwave treatments on the antigenicity of gliadin in medium wheat dough. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 55-60.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.
- Lähdeaho, M. L., Kaukinen, K., Laurila, K., Vuotikka, P., Koivurova, O. P., Kärjä-Lahdensuu, T., Marcantonio, A., Adelman, D. C., & Mäki, M.** (2014). Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 146(7), 1649-1658.
- Lam, R. S., & Nickerson, M. T.** (2013). Food proteins: a review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food chemistry*, 141(2), 975-984.
- Lamacchia, C., Di Luccia, A. & Gianfrani C.** (2015). Method for the detoxification of gluten proteins from grains of cereals. BioVaria Congress, Europe's top technologies, Munchen, Germany, <https://www.biovaria.org/past-event/technologies/>.
- Lamacchia, C., Landriscina, L., & D'Agnello, P.** (2016). Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food chemistry*, 197, 634-640.
- Lamireau, T., & Clouzeau, H.** (2013). Épidémiologie de la maladie cœliaque. *Pathologie Biologie*, 61(2), e1-e4.
- Lammers, K. M., Herrera, M. G., & Doderio, V. I.** (2018). Translational Chemistry Meets Gluten-Related Disorders. *ChemistryOpen*, 7(3), 217-232.
- Laursen, L.** (2016). Erratum: Will Europe toast GM wheat for gluten sufferers?. *Nature biotechnology*, 34(10), 1072-1072.
- Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F., & Green, P. H.** (2015). Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*, 351, h4347

- Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H.** (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70-81.
- Lebwohl, B., & Rubio-Tapia, A.** (2020). Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*.
- Lemelin, E., Aussenac, T., Violleau, F., Salvo, L., & Lein, V.** (2005). Impact of cultivar and environment on size characteristics of wheat proteins using asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Cereal chemistry*, 82(1), 28-33.
- Leonard, M. M., Sapone, A., Catassi, C., & Fasano, A.** (2017). Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *Jama*, 318(7), 647-656.
- Leszczynska, J., Łącka, A., Szemraj, J., Lukamowicz, J., & Zegota, H.** (2003). The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *European Food Research and Technology*, 217(5), 387-391.
- Li, W., Dobraszczyk, B. J., Dias, A., & Gil, A. M.** (2005). The conformation and aggregated structure of gluten fractions. In *Using Cereal Science and Technology for the Benefit of Consumers*. Woodhead Publishing, 180-186.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Malamut, G., & Cellier, C.** (2010). Maladie cœliaque. *La revue de médecine interne*. 31, 428-433.
- Marinciu, C., & Săulescu, N. N.** (2008). Cultivar effects on the relationship between grain protein concentration and yield in winter wheat. *Romanian Agricultural Research*, 25, 19-27.
- Marti, T., Molberg, Ø., Li, Q., Gray, G. M., Khosla, C., & Sollid, L. M.** (2005). Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(1), 19-26.
- Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., & Kasarda, D. D.** (1998). Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiology*, 118(4), 1147-1158.
- McAllister, B. P., Williams, E., & Clarke, K.** (2019). A comprehensive review of celiac disease/gluten-sensitive enteropathies. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 57(2), 226-243.
- Melini, V., & Melini, F.** (2019). Gluten-free diet: Gaps and needs for a healthier diet. *Nutrients*, 11(1), 170.
- Meazza, C., & Bozzola, M.** (2014). Diagnostic approach to short stature in children with celiac disease. In *Celiac Disease: An Update* (pp. 49-76). Nova Science Publishers, Inc..

- Mazzarella, G., Salvati, V. M., Iaquinto, G., Stefanile, R., Capobianco, F., Luongo, D., Bergamo, P., Maurano, F., Giardullo, N., Malamisura, B., & Rossi, M.** (2012). Reintroduction of gluten following flour transamidation in adult celiac patients: a randomized, controlled clinical study. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
- McGowan, K. E., Lyon, M. E., & Butzner, J. D.** (2008). Celiac disease and IgA deficiency: complications of serological testing approaches encountered in the clinic. *Clinical chemistry*, 54(7), 1203-1209.
- Mello, P. A., Barin, J. S., & Guarnieri, R. A.** (2014). Microwave heating. In *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*. Elsevier, 59-75.
- Mena, M., & Sousa, C.** (2015). Analytical tools for gluten detection: Policies and regulation. *OmniaScience Monographs*.
- Molkhou, P.** (2007). Intolérance et allergie au blé. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 20(5), 228-232.
- Morel, M. H., Redl, A., & Guilbert, S.** (2002). Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromolecules*, 3(3), 488-497.
- Moreno Amador, M. D. L., Arévalo-Rodríguez, M., Durán, E. M., Martínez Reyes, J. C., & Sousa Martín, C.** (2019). A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *PLoS one*, 14(6), e0218346.
- Mounir, S., & Allaf, K.** (2014). DIC-assisted hot air drying of post-harvest paddy rice. In *Instant Controlled Pressure Drop (DIC) in Food Processing*. Springer, New York, NY, 45-55.
- Mouterde, O., Dumant, C., & Mallet, E.** (2011). Les manifestations de la maladie cœliaque chez l'enfant. *Pathologie Biologie*, 61(3), e53-e55.
- Nakai, S., & Modler, H. W. (Eds.)**. (1996). Food proteins: properties and characterization. John Wiley & Sons. 560 p.
- Nawrocka, A., Miś, A., & Szymańska-Chargot, M.** (2016). Characteristics of relationships between structure of gluten proteins and dough rheology—influence of dietary fibres studied by FT-Raman spectroscopy. *Food biophysics*, 11(1), 81-90.
- Niland, B., & Cash, B. D.** (2018). Health benefits and adverse effects of a gluten-free diet in non-celiac disease patients. *Gastroenterology & hepatology*, 14(2), 82.
- Nion-Larmurier, I., & Cosnes, J.** (2009). Maladie cœliaque. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 33(6-7), 508-517.
- Olives, J. P.** (2013). La maladie cœliaque. *Post'U (2013)* 13, 20.
- Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., & Soliva-Fortuny, R.** (2010). Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 13.
- Ooms, N., & Delcour, J. A.** (2019). How to impact gluten protein network formation during wheat flour dough making. *Current opinion in food science*, 25, 88-97.

- Ortiz, C., Valenzuela, R., & Lucero Alvarez, Y.** (2017). Celiac disease, non celiac gluten sensitivity and wheat allergy: comparison of 3 different diseases triggered by the same food.
- Ortolan, F., & Steel, C. J.** (2017). Protein characteristics that affect the quality of vital wheat gluten to be used in baking: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(3), 369-381.
- Osman, A. A., Uhlig, H. H., Valdes, I., Amin, M., Méndez, E., & Mothes, T.** (2001). A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 13(10), 1189-1193.
- Pena, E., Bernardo, A., Soler, C., & Jouve, N.** (2006). Do tyrosine crosslinks contribute to the formation of the gluten network in common wheat (*Triticum aestivum L.*) dough?. *Journal of Cereal Science*, 44(2), 144-153.
- Panneton, B., Vincent, C., & Fleurat-Lessard, F.** (2000). Place de la lutte physique en phytoprotection. C. Vincent, B. Panneton et F. Fleurat-Lessard (éds.), *La lutte physique en phytoprotection. Institut national de la recherche agronomique, Paris*, 1-25.
- Panozzo, A., Manzocco, L., Lippe, G., & Nicoli, M. C.** (2016). Effect of pulsed light on structure and immunoreactivity of gluten. *Food chemistry*, 194, 366-372.
- Piper, J. L., Gray, G. M., & Khosla, C.** (2004). Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 213-219.
- Popineau, Y., Huchet, B., Larré, C., & Bérot, S.** (2002). Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 327-335.
- Pyle, G. G., Paaso, B., Anderson, B. E., Allen, D. D., Marti, T., Li, Q., Siegel, M., Khosla, C., & Gray, G. M.** (2005). Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(7), 687-694.
- Qu, C., Wang, H., Liu, S., Wang, F., & Liu, C.** (2017). Effects of microwave heating of wheat on its functional properties and accelerated storage. *Journal of food science and technology*, 54(11), 3699-3706.
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L.** (2016). Shear, heat and pH induced conformational changes of wheat gluten—Impact on antigenicity. *Food chemistry*, 196, 180-188.
- Rampertab, S. D., Pooran, N., Brar, P., Singh, P., & Green, P. H.** (2006). Trends in the presentation of celiac disease. *The American journal of medicine*, 119(4), 355-e9.
- Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N.** (2010). Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2772-2777.
- Ribeiro, M., Nunes, F. M., Guedes, S., Domingues, P., Silva, A. M., Carrillo, J. M., Rodriguez-Quijano, M., Branlard, G., & Igrejas, G.** (2015). Efficient chemo-enzymatic

- gluten detoxification: reducing toxic epitopes for celiac patients improving functional properties. *Scientific reports*, 5, 18041.
- Ribeiro, M., Rodriguez-Quijano, M., Nunes, F. M., Carrillo, J. M., Branlard, G., & Igrejas, G.** (2016). New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes. *Food chemistry*, 213, 8-18.
- Ribeiro, M., Nunes, F. M., Rodriguez-Quijano, M., Carrillo, J. M., Branlard, G., & Igrejas, G.** (2018). Next-generation therapies for celiac disease: The gluten-targeted approaches. *Trends in food science & technology*, 75, 56-71.
- Roussel, P., Hubert, C.** (2002). Les Pains Français, Qualité Production, 50-52.
- Salentijn, E. M., Mitea, D. C., Goryunova, S. V., van der Meer, I. M., Padioleau, I., Gilissen, L. J., Koning, F., & Smulders, M. J.** (2012). Celiac disease T-cell epitopes from gamma-gliadins: immunoreactivity depends on the genome of origin, transcript frequency, and flanking protein variation. *BMC genomics*, 13(1), 277.
- Salmi, T. T., Hervonen, K., Kautiainen, H., Collin, P., & Reunala, T.** (2011). Prevalence and incidence of dermatitis herpetiformis: a 40-year prospective study from Finland. *British Journal of Dermatology*, 165(2), 354-359.
- Sapone, A., Lammers, K. M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M. T., De Rosa, M., Stefanile R, Mazzarella, G., Tolone, C., Russo, M. I., Esposito, P., Ferraraccio, F., Carten, M., Riegler, G., Magistris, L., & Fasano, A.** (2011). Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC medicine*, 9(1), 1-11.
- Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., & Fasano, A.** (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC medicine*, 10(1), 1-12.
- Scherf, K. A., Koehler, P., & Wieser, H.** (2016). Gluten and wheat sensitivities—an overview. *Journal of Cereal Science*, 67, 2-11.
- Scherf, K. A.** (2019). Immunoreactive cereal proteins in wheat allergy, non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) and celiac disease. *Current opinion in food science*, 25, 35-41.
- Schumann, M., Richter, J. F., Wedell, I., Moos, V., Zimmermann-Kordmann, M., Schneider, T., Daum, S., Zeitz, M., Fromm, M., & Schulzke, J. D.** (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the  $\alpha$ 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*, 57(6), 747-754.
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., & Khosla, C.** (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297(5590), 2275-2279



- Shan, L., Marti, T., Sollid, L. M., Gray, G. M., & Khosla, C.** (2004). Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochemical Journal*, 383(2), 311-318.
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S.** (1997). Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *Journal of cereal science*, 25(3), 207-227.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., & Tatham, A. S.** (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1418), 133-142.
- Shewry, P. R.** (2003). Wheat gluten proteins. *Wheat Gluten Protein Analysis*, Ed. Shewry, P. R. and Lookhart, G. L. St Paul, MN: AACC. 1–17.
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S.** (2016). Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *Journal of Cereal Science*, 67, 12-21.
- Siegel, M., Garber, M. E., Spencer, A. G., Botwick, W., Kumar, P., Williams, R. N., Kozuka, K., Shreeniwas, R., Pratha, V., & Adelman, D. C.** (2012). Safety, tolerability, and activity of ALV003: results from two phase 1 single, escalating-dose clinical trials. *Digestive diseases and sciences*, 57(2), 440-450.
- Sine, J. P.** (2003). Séparation et analyse des biomolécules: méthodes physicochimiques: cours et exercices. Ellipses. 253 p.
- Singh, N. K., Shepherd, K. W., & Cornish, G. B.** (1991). A simplified SDS—PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of cereal science*, 14(3), 203-208.
- Singh, H., & MacRitchie, F.** (2004). Changes in proteins induced by heating gluten dispersions at high temperature. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 297-301.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O., & Waterhouse, G. I. N.** (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131(3), 802-810.
- Stammaes, J., & Sollid, L. M.** (2015). Celiac disease: autoimmunity in response to food antigen. In *Seminars in immunology* 27(5), (pp. 343-352). Academic Press.
- Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J. C., Rabesona, H., Nioi, C., Agarwal, D., Drouet, M., Chobert, J-M., Bordbar, A-K & Haertle, T.** (2009). Effects of heating and glycation of  $\beta$ -lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 57(11), 4974-4982.
- Takács, K., Guillamon, E., Pedrosa, M. M., Cuadrado, C., Burbano, C., Muzquiz, M., Haddad, J., Allaf, K., Maczó, A., Polgár, M & Gelencsér, É.** (2014). Study of the effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on IgE-reactive legume-protein patterns by electrophoresis and immunoblot. *Food and agricultural immunology*, 25(2), 173-185.

- Takeda, K., Matsumura, Y., & Shimizu, M.** (2001). Emulsifying and surface properties of wheat gluten under acidic conditions. *Journal of food science*, 66(3), 393-399.
- Tang, J., & Resurreccion Jr, F. P.** (2009). Electromagnetic basis of microwave heating. In *Development of packaging and products for use in microwave ovens* (pp. 3-38e). Woodhead Publishing.
- Tatham, A. S., Mifflin, B. J., & Shewry, P. R.** (1985). The Beta turn Conformation in Wheat gluten protein: Relationship to Gluten Elasticity. *Cereal Chemistry*, 62(5), 405-412.
- Tatham, A. S., & Shewry, P. R.** (1985). The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -and  $\omega$ -gliadins. *Journal of Cereal Science*, 3(2), 103-113.
- Taylor, S. (Ed.).** (2003). *Advances in Food and Nutrition Research: Cumulative Index: Volumes 1-45* (Vol. 46). Gulf Professional Publishing.
- Thaon, I., & Penven, E.** (2016). Asthme de boulanger. *Revue française d'allergologie*, xxx, .xxx-xxx.
- Thierry, H., Laurent, F., Jean-Luc, S.** (2014). Chimie des polymères ? Exercices et problèmes corrigés .2 eme Éd. 587 p.
- Tonello, C.** (1998). Applications des hautes pressions en agroalimentaire. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2(F3220), F3220-1.
- Tonutti, E., & Bizzaro, N.** (2014). Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmunity reviews*, 13(4-5), 472-476.
- Tovoli, F., Masi, C., Guidetti, E., Negrini, G., Paterini, P., & Bolondi, L.** (2015). Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 3(3), 275.
- Tuhumury, H. C. D., Small, D. M., & Day, L.** (2014). The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 229-237.
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., van Rood, J. J., Spaenij, L., & Koning, F.** (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12390-12395.
- Veraverbeke, W. S., & Delcour, J. A.** (2002). Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical reviews in food science and nutrition*, 42(3), 179-208.
- Verkarre, V., & Brousse, N.** (2013). Le diagnostic histologique de la maladie cœliaque. *Pathologie Biologie*, 61(2), e13-e19.
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., & Polzonetti, V.** (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1236-1241.
- Wahlund, K. G., Gustavsson, M., MacRitchie, F., Nylander, T., & Wannerberger, L.** (1996). Size characterisation of wheat proteins, particularly glutenin, by asymmetrical flow field-flow fractionation. *Journal of Cereal Science*, 23(2), 113-119.

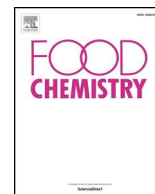
- Wang, P., Chen, H., Mohanad, B., Xu, L., Ning, Y., Xu, J., Wu, F., Yang, N., Jin, Z., & Xu, X.** (2014). Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: Studies on gluten-, glutenin-and gliadin-rich fractions. *Food hydrocolloids*, 39, 187-194.
- Wang, P., Jin, Z., & Xu, X.** (2015). Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage—A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 189-198.
- Wang, K. Q., Luo, S. Z., Zhong, X. Y., Cai, J., Jiang, S. T., & Zheng, Z.** (2017). Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation. *Food Chemistry*, 214, 393-399.
- Warchalewski, J. R., Gralik, J., Grundas, S., Pruska-Kędzior, A., & Kędzior, Z.** (2011). Changes in microwave-treated wheat grain properties. *Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials*, 22, 503-530.
- Wellner, N., Mills, E. C., Brownsey, G., Wilson, R. H., Brown, N., Freeman, J., Halford, N. G., Shewry, P. R., & Belton, P. S.** (2005). Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6(1), 255-261.
- Wieser, H., Antes, S., & Seilmeier, W.** (1998). Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal chemistry*, 75(5), 644-650.
- Wieser, H.** (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24(2), 115-119.
- Wieser, H., & Koehler, P.** (2012). Detoxification of gluten by means of enzymatic treatment. *Journal of AOAC international*, 95(2), 356-363.
- Wolf, C., Siegel, J. B., Tinberg, C., Camarca, A., Gianfrani, C., Paski, S., Guan, R., Montelione, G., Baker, D., & Pultz, I. S.** (2015). Engineering of Kuma030: a gliadin peptidase that rapidly degrades immunogenic gliadin peptides in gastric conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 137(40), 13106-13113.
- Yalcin, E., Sakiyan, O., Sumnu, G., Celik, S., & Koksel, H.** (2008). Functional properties of microwave-treated wheat gluten. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1411-1417.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., & Ishii, K.** (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(5), 719-727.
- Yong, Y. H., Yamaguchi, S., & Matsumura, Y.** (2006). Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(16), 6034-6040.
- Zaidi, A., C., Benbelkacem, A., & Brinis, L.** (2018). Etude de lignées de blé tendre utilisées dans un programme d'amélioration génétique pour la résistance à la rouille jaune en Algérie. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 36, 21-31.
- Zannini, E., Kingston, W., Arendt, E. K., & Waters, D. M.** (2013). Technological challenges and strategies for developing low-protein/protein-free cereal foods for specific dietary management. *Food research international*, 54(1), 935-950.

- Zayas, J. F.** (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of proteins in food* (pp. 6-75). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Zayas, J. F.** (2012). *Functionality of proteins in food*. Springer Science & Business Media. 373.
- Zhang, H., Claver, I. P., Zhu, K. X., & Zhou, H.** (2011). The effect of ultrasound on the functional properties of wheat gluten. *Molecules*, *16*(5), 4231-4240.
- Zhang, L., Zhang, F., & Wang, X.** (2015). Effects of hydrolyzed wheat gluten on the properties of high-temperature ( $\geq 100^{\circ}\text{C}$ ) treated surimi gels. *Food hydrocolloids*, *45*, 196-202.
- Żukowska, E. A., Rudnik, E., & Kijeński, J.** (2008). Foaming properties of gluten and acetylated gluten: Studies of the mathematical models to describe liquid drainage. *Journal of cereal science*, *47*(2), 233-238.

*Valorisation scientifique*

### *Article 1:*

*How microwave treatment of gluten affects its toxicity for celiac patients? A study on the effect of microwaves on the structure, conformation, functionality and immunogenicity of gluten*



# How microwave treatment of gluten affects its toxicity for celiac patients? A study on the effect of microwaves on the structure, conformation, functionality and immunogenicity of gluten

Hamida Mahroug<sup>a,1</sup>, Miguel Ribeiro<sup>b,c,d,e,1</sup>, Larbi Rhazi<sup>f</sup>, Leila Bentallah<sup>a</sup>, Mohammed Nasreddine Zidoune<sup>a</sup>, Fernando M. Nunes<sup>b,\*</sup>, Gilberto Igrejas<sup>c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Nutrition et de Technologies Alimentaires LNTA – Institut de Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires, Université Frères Mentouri Constantine 1, Algeria

<sup>b</sup> CQ-VR, Chemistry Research Center, Vila Real, Food and Wine Chemistry Lab, Chemistry Department, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>c</sup> Functional Genomics and Proteomics Unit, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>d</sup> Department of Genetics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal

<sup>e</sup> LAQV-REQUIMTE, Faculty of Science and Technology, University Nova of Lisbon, Lisbon, Portugal

<sup>f</sup> UniLaSalle, Unité de recherche "Transformations & Agro-Ressources", 19 rue Pierre Waguet – BP 30313, F-60026 Beauvais Cedex, France

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Wheat  
Gluten  
Microwave  
Celiac disease  
Rheology  
Protein structure

## ABSTRACT

The microwave heating of wheat kernels, flour, and gluten, has attracted attention lately because it has been claimed to abolish gluten toxicity for celiac patients. Nevertheless, contradictory results have been reported regarding the effect on gluten celiac-immunotoxicity. In order to better understand the effect of the microwave treatment on gluten structure, conformation, functionality and celiac-immunotoxicity, a central composite design with two factors, power level, and treatment time, was used to investigate a possible quadratic and interaction effects between both factors. Extractable gliadins content was affected by the power and time in a linear and quadratic fashion; extractable glutenins were not affected. Gluten secondary structure was affected by the microwave treatment and related to the polymer's disaggregation phenomenon observed. In fact, the microwave treatment increased the amount of potentially toxic epitopes released after peptic and tryptic digestion, showing inefficiency as a treatment to detoxify the gluten for celiac disease patients.

## 1. Introduction

Celiac disease (CD) is a complex disorder characterized by an immune-mediated reaction to gluten that occurs in genetically predisposed individuals. Celiac patients react to dietary proteins, named prolamins, which are rich in proline and glutamine residues, including wheat gliadins and glutenins, rye secalins and barley hordeins (Lebwohl, Sanders, & Green, 2018). Statistics indicate that approximately 1% of the global population suffers from CD. In some countries like Algeria, the prevalence of CD is even higher reaching approximately 5.6% (Tonutti & Bizzaro, 2014). Its prevalence continues to be on the rise, and patients suffering from CD are faced with the daunting task of completely eliminating gluten from their diets in order to ameliorate or normalize the symptomatology, as this is the only treatment available. This task is made even more burdensome by the high

cost of gluten-free foods. Also, their technological performances are barely satisfactory (Zannini, Kingston, Arendt, & Waters, 2013). Moreover, the gluten-free diet can cause nutrient deficiencies because gluten-free products often contain less fibre, magnesium, and folic acid than gluten products and higher amounts of saturated fat, total fat and sugar (Vici, Belli, Biondi, & Polzonetti, 2016).

In this context, some research studies are being conducted aimed at the improvement of the technological, nutritional and organoleptic properties of gluten-free foods (Bourekoua, Benatallah, Zidoune, & Rosell, 2016; Capriles, dos Santos, & Areas, 2016). Other studies are focused on the chemical and enzymatic modification of gluten in order to reduce its immunological and toxic properties, in particular, the transamidation of glutamine residues (Gianfrani et al., 2007; Ribeiro et al., 2015) or the proteolysis of immunodominant epitopes (Pyle et al., 2005). The molecular reorganization of gluten to a new supramolecular

\* Corresponding authors at: Chemistry Research Center – Vila Real, Food and Wine Chemistry Lab, Portugal (F.M. Nunes) and Functional Genomics and Proteomics Unit, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal (G. Igrejas).

E-mail addresses: [fnunes@utad.pt](mailto:fnunes@utad.pt) (F.M. Nunes), [gigrejas@utad.pt](mailto:gigrejas@utad.pt) (G. Igrejas).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this project.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124986>

Received 22 February 2019; Received in revised form 1 June 2019; Accepted 10 June 2019

Available online 11 June 2019

0308-8146/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

architecture induced by chitosan was also recently proposed (Ribeiro et al., 2018). Physical treatments, like the microwave treatment of wheat kernels, were proposed to abolish the immunogenic properties of gluten proteins for celiac patients (Lamacchia, Landriscina, & D'Agnello, 2016), nevertheless the use of the microwave treatment for abolishing wheat gluten toxicity remains controversial as there is scientific evidence showing the inefficiency of this approach (Gianfrani et al., 2017; Leszczynska, Łacka, Szmraj, Lukamowicz, & Zegota, 2003). On the other hand, the microwave treatment of wheat flour and gluten results in a change of its rheological properties and functionality depending on the power and treatment time applied. A decrease in the bread-making potential is often observed with increasing time of exposure to the microwaves (Qu, Wang, Liu, Wang, & Liu, 2017). Moreover, the microwave treatment has been mostly applied to wheat kernels and flours being difficult to isolate the effect on gluten proteins only. Therefore, the aim of the present study was to gain a deeper understanding of the effect of the microwave treatment of gluten on its functionality, structure, conformation and more importantly on the gluten celiac-related toxicity. For this purpose, a central composite design was used in order to explore the combined effect of power and treatment time or their interaction on gluten properties aiming to build a deeper understanding of the microwave treatment of gluten and its potential for the development of an alternative to the gluten-exclusion diet.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Fine powder of vital wheat gluten was provided by PPlus Ingredients Company (Algiers, Algeria) with the following composition according to the manufacturer: 80% of protein, 6% of moisture, 1% of ash, 7% of total fat, 9% of starch and less than 1% of cellulose.

### 2.2. Experimental design

In order to evaluate the linear and quadratic effects of the microwave power level (X1) and time of microwave treatment (X2) and their interaction (X1X2) on the gluten properties under study (temperature, moisture content, extractable gliadins, extractable glutenins, free sulfhydryl group content, R5 reactivity of the peptides released after simulated gastric and intestinal digestion, maximum resistance to extension -  $R_{max}$  and total extensibility - Ext) a response surface methodology (RSM) was carried out using a central composite design (CCD). The SDS-PAGE profiles, the secondary structure and the macromolecular features of the polymers were studied independently to the RSM. The ranges of the variables were selected according to preliminary tests conducted by heating the gluten (minimum values) and avoid burning it (maximum values). The microwave treatment was performed with domestic microwave equipment (Condor, Algeria) and the values of two variables, power level, and treatment time, are indicated in Supplementary Table 1. Thirteen experiments were performed: four tests of factorial points, four axial points and five repetitions of the central point (Supplementary Table 2). The effects of the two factors on the different responses were represented using the following polynomial quadratic regression equation:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

where:

- Y: response variable;
- $b_0$ : intercept;
- $b_1$  and  $b_2$ : linear regression coefficients;
- $b_{11}$   $b_{22}$ : quadratic regression coefficients;
- $b_{12}$ : Interaction regression coefficient.

Regression coefficients were calculated with normalized factors and using pure error as the ANOVA error term. The non-significant effects were ignored for the graphical representation.

### 2.3. Temperature monitoring

The temperature of the gluten samples treated by the microwaves was monitored using an electronic probe thermometer. The temperature was measured in duplicate.

### 2.4. Determination of moisture content

The moisture content of the control gluten and the microwave treated glutes, was determined according to the AACC Approved Method 44-19 (AACC, 1999). The moisture content was measured in duplicate.

### 2.5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE experiments were performed using the sequential procedure of Singh, Shepherd, and Cornish (1991). Gliadins and glutenins of gluten were extracted from a fine powder of wheat gluten. Briefly, gliadins were extracted with 50% (v/v) aqueous 1-propanol, dried at 65 °C overnight and dissolved in the sample buffer. The pellet containing the glutenins was washed twice with 50% (v/v) aqueous 1-propanol to ensure complete removal of gliadins. Then, the glutenins were reduced and alkylated in a 50% (v/v) 1-propanol solution with 1% (w/v) dithiothreitol (DTT) and 1.4% (w/v) 4-vinylpyridine, respectively. After centrifugation, the sample buffer (1:1) was added to the supernatant. The gliadin and glutenin fractions were separated in a resolving gel using 10.3% and 12.5% T (total monomer percentage); 1.3% and 0.97% C (weight percentage of crosslinker), respectively, in a vertical electrophoresis system (Hoefer, SE600, San Francisco, CA, USA).

### 2.6. Quantification of gluten proteins by reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

The gliadins and glutenins were separated according to their hydrophobicity by RP-HPLC as described by Wieser, Antes, and Seilmeier (1998) after extraction using the method described above (Singh et al., 1991). For the HPLC analysis, a RP-C8 column was used (Macherey-Nagel, Germany, 25 cm × 4.5 mm i.d. × 5 μm) and maintained at 50 °C during the separation process. An injection volume of 50 μL for the glutenins and 100 μL for the gliadins was used. A gradient elution was performed using the following eluents: eluent A – 0.1% (v/v) aqueous trifluoroacetic acid and eluent B - acetonitrile and trifluoroacetic acid (99.9/0.1%, v/v). The following elution program was used: 0 min 28% B, 30 min 56% B, using a flow rate of 1 mL/min. Detection was performed by ultraviolet (UV) absorbance at 210 nm. After each analysis, the column was cleaned by using 90% B during 5 min and equilibrated to 28% B during 10 min. The quantification of proteins was performed using a standard curve of bovine serum albumin (Ribeiro et al., 2016).

### 2.7. Free sulfhydryl content analysis

The free sulfhydryl content of gluten was determined according to the method of Chan and Wasserman (Chan & Wasserman, 1993) with slight modifications (Tuhumury, Small, & Day, 2014). Gluten samples (10 mg) were suspended in 1.0 mL of reaction buffer containing 8 mol/L urea, 3 mmol/L EDTA, 1% SDS, and 0.2 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 (Buffer A). Samples were vortexed for 30 s and shaken on a constant platform shaker at room temperature for 1 h. Buffer B containing 10 mmol/L 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in 0.2 mol/L Tris-HCl, pH 8.0



(0.1 mL) was then added to each sample and shaken for a further period of 1 h. Samples were then centrifuged at 13,600g for 15 min at room temperature. The absorbance of the supernatant was determined at 412 nm using an UV–VIS spectrophotometer (LLG-uniSPEC 2, France) against a blank containing 1.0 mL of buffer A and 0.1 mL of buffer B (Tuhumury et al., 2014). The concentration of free sulfhydryl groups expressed as ( $\mu\text{mol/g}$  of protein) was calculated using the following equation:

$$\text{Free SH} = \frac{A \times D}{\epsilon \times C}$$

Where:

- A: absorbance at 412 nm;
- D: dilution factor;
- $\epsilon$ : extinction coefficient  $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;
- C: gluten concentration (mg/ml).

The analysis was performed in triplicate.

### 2.8. Changes in secondary structure of gluten proteins

To evaluate the changes in the secondary structure of gluten proteins when treated by microwaves, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used. The FTIR spectra were recorded in the 4000 and  $400 \text{ cm}^{-1}$  range by co-addition of 128 scans and a  $4 \text{ cm}^{-1}$  resolution using an IRAffinity-1S Fourier Transform Infrared Spectrometer (Shimadzu, IZASA Scientific, France) equipped with a single-reflection diamond attenuated total reflection (ATR) crystal and a mercury-cadmium-telluride (MCT) detector. The measurement of each sample was repeated five times and averaged. The diamond crystal was carefully cleaned with 70% ethanol and distilled water after each measurement. The spectra collection and baseline correction were performed using the Lab solutions IR software. The number and the position of peaks were determined by the second derivative method. For deconvolution of the amide I band ( $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ ) region the Peak fit software (v4.6, SPSS Inc, USA) was used. The iterative data fitting was performed until a correlation coefficient higher than 0.995 was obtained. The relative peak areas of the absorbance bands were expressed as a percentage of the area of the fitted region (Sivam, Sun-Waterhouse, Perera, & Waterhouse, 2012).

### 2.9. Asymmetrical flow field flow fractionation (A-FFFF) system and procedure

Samples were prepared and analysed according to the protocol of protein extraction, described in detail by (Lemelin, Aussenac, Violleau, Salvo, & Lein, 2005) and (Gozé et al., 2017). Briefly, flour samples (30 mg) were dispersed and incubated at  $60^\circ \text{C}$  for 15 min with 1.0 mL of 0.05 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 2% (w/v) SDS. The extracts were then sonicated for 20 s at a power setting of 30%. The supernatant (centrifugation at  $12,500 \times g$  at  $20^\circ \text{C}$  for 15 min), was filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  filters (Gelman Sciences, France) before injection (30  $\mu\text{L}$ ) into the AFFFF/MALLS system. Protein content was determined for each extract by combustion nitrogen analysis. AF4 was accomplished with an Eclipse3 F System (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) serially connected to a UV detector (Agilent 1200, Agilent Technologies, Germany), MALLS detector (Dawn multi-angle Heleos TM, Wyatt Technology Corporation, Europe) and an interferometric refractometer (Optilab rEX, Wyatt Technology Corporation, Europe). Absorbance was measured at 214 nm. The channel had a trapezoidal geometry and a length of 286 mm. The thickness of the spacer used in this experiment was 350  $\mu\text{m}$ . The ultrafiltration membrane forming the accumulation wall was made of regenerated cellulose with a cut-off of 10 kDa (LC-10 Nadir reg. Cell, Wyatt Technology Europe Germany). An Agilent 1200 Series Isocratic HPLC Pump

(Agilent Technologies, Germany) with an in-line vacuum degasser delivered the carrier flow to the channel. A  $0.45 \mu\text{m}$  in-line filter (Gelman Sciences, France) was installed between the main pump and the Eclipse system. Sodium phosphate buffer (0.05 mol/L, pH 6.9) containing 0.1% (w/v) SDS was used as mobile phase and was filtered through a  $0.1 \mu\text{m}$  membrane (Gelman Sciences, France). For the fractionations using a gradient in the cross flow, the focus time was 0.5 min at a flow rate of 2 mL/min, followed by a focus/injection time of 1.0 min at 0.2 mL/min and a relaxation/focusing time of 0.5 min. Elution then followed at an outflow rate ( $F_{\text{out}}$ ) of 1.0 mL/min and with a cross-flow rate ( $F_c$ ) decreasing exponentially from 3.0 to 0.0 mL/min for 14 min. Finally, elution at a cross-flow rate of 0.0 mL/min was maintained for 9 min.

### 2.10. Size-exclusion chromatography (SEC)

Proteins from the control and microwave treated samples were extracted according to the SDS (sodium dodecyl sulphate) sequential extraction procedure (Carceller & Aussenac, 1999; Gupta, Khan, & Macritchie, 1993). The total polymeric protein was separated into two size fractions based on its extractability in 2% (w/v) SDS-phosphate buffer (without sonication), i.e. extractable (F1s + F2s) and unextractable (F1i + F2i) fractions. Briefly, samples (0.01 g) were suspended in 1 mL of 0.05 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 2% (w/v) SDS and stirred for 2 h at  $60^\circ \text{C}$ . These extractions were followed by centrifugation (12,500g, 30 min at  $20^\circ \text{C}$ ) to obtain a supernatant containing extractable polymeric protein EPP (F1s + F2s). Unextractable polymeric protein UPP (F1i + F2i) was then sonicated for 20 s at 30% power (output 25 W, 23 kHz) in 1 mL of 2% SDS-phosphate buffer using a stepped microtip probe (3 mm diameter) to solubilize the remaining protein (unextractable proteins). Both extracts were filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  regenerated cellulose filters (Gelman Sciences, France) and 25  $\mu\text{L}$  were then injected onto a TSKgel G4000 SW (TOSHAAS, Stuttgart, Germany) size exclusion analytical column ( $7.5 \times 300 \text{ mm}$ ,  $8 \mu\text{m}$ ). The HPLC apparatus was Agilent 1200 (Agilent Technologies, Germany) consisting of an online degasser, an isocratic pump, a variable auto-injector and a variable wavelength detector (set at 214 nm). Sodium phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 6.9) containing 0.1% (w/v) SDS was used as eluent with a flow rate of  $0.7 \text{ mL min}^{-1}$ . During the fractionation, the column was maintained at  $25^\circ \text{C}$ . For the extractable fraction, the elution profile was divided into four main peaks corresponding to polymeric glutenin proteins (F1s + F2s), gliadins (F3) and functional proteins (F4) (Fig. 3C; Supplementary Fig. 1). The percentage of unextractable polymeric protein in total polymeric protein (TPP) was calculated as follows:

$$\frac{\text{UPP}}{\text{TPP}} (\%) = \frac{\text{F1i} + \text{F2i areas (unextractable)}}{\text{F1s} + \text{F2s areas (extractable)} + \text{F1i} + \text{F2i areas (unextractable)}} \times 100$$

The unextractable polymeric protein to extractable polymeric protein ratio:

$$\frac{\text{UPP}}{\text{EPP}} = \frac{\text{F1i} + \text{F2i areas (unextractable)}}{\text{F1s} + \text{F2s areas (extractable)}}$$

The unextractable gliadin protein (Glii) to extractable gliadin protein (Glis) ratio:

$$\frac{\text{Glii}}{\text{Glis}} = \frac{\text{F3i areas (unextractable)}}{\text{F3s areas (extractable)}}$$

### 2.11. Micro-extension tests

Micro-extension tests on the rehydrated gluten were made using a texture analyser TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, United Kingdom) fitted with the SMS/Kieffer dough and gluten

extensibility rig. First, 5 g of dried gluten were rehydrated with 10 mL of distilled water at 20 °C for 15 min and centrifuged (10 min, 5000g, 20 °C) (Kieffer, Schurer, Kohler, & Wieser, 2007). After a resting time of 20 min at 30 °C under a water-saturated atmosphere, wet gluten was brushed with paraffin oil, to avoid sample adhesion, and pressed into a Teflon mould pre-warmed to 30 °C. After a further 40 min at 30 °C under a water-saturated atmosphere, it was analysed. The maximum resistance to extension ( $R_{max}$ ) and total extensibility (Ext) were determined in triplicate (Ribeiro et al., 2015).

### 2.12. In vitro digestion and R5 competitive ELISA immunoassay

The R5 Competitive ELISA was used to quantify the potential immunogenic peptides (RIDASCREEN® Gliadin competitive, R-Biopharm AG Darmstadt, Germany). In vitro digestion of gluten was conducted as previously described (Gessendorfer, Koehler, & Wieser, 2009). First, control gluten and microwave treated gluten were dispersed in distilled water at a ratio of 5% (w/v) and the pH was adjusted to 1.8 using a solution of 1 mol/L HCl. After dispersion, 2.5 mg of pepsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Italy) were added and allowed to catalyse the gluten hydrolysis for 4 h under shaking at 37 °C. Subsequently, the pH was adjusted to 7.8 with NaOH 1 mol/L and 2.5 mg of trypsin (Gibco, Life Technology, UK) were added and the mixture was incubated as described above. Finally, the pH was adjusted to 4.5 with a solution of 1 mol/L HCl and the peptic-tryptic digests were centrifuged at 4000g for 20 min at room temperature. Then, the supernatant was freeze-dried. The peptic-tryptic digests (PT) were analysed in duplicate using the R5 Competitive ELISA immunoassay, using a microplate reader (Multiskan EX Labsystems, USA).

### 2.13. Statistical analysis

The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). All results were corrected for a 14% moisture content. The experimental design and data analysis were performed using the statistical package STATISTICA from Statsoft (v10; Tulsa, Oklahoma, USA). The differences among the different means were determined by one-way analysis of variance (ANOVA). Multiple comparisons were performed using the two-stage step-up method of Benjamini, Krieger, and Yekutieli (2006).

## 3. Results and discussion

The gluten used in this work presented a protein profile (Ribeiro et al., 2015), polymeric composition and organization (unextractable and extractable polymeric protein) (Gupta et al., 1993) and hydrodynamic parameters of the polymeric material (Ribeiro et al., 2019) similar to those obtained for wheat flours, therefore being similar and representative of that present in unprocessed wheat flours.

The different parameters analysed, including the maximum temperature achieved during microwave treatment, moisture content, and content of gluten proteins measured by RP-HPLC, free SH groups, R5 reactivity after peptic and tryptic digestion,  $R_{max}$  and Ext, the abundance of secondary structures and the macromolecular features of polymers are shown in Table 1.

The regression coefficients for the significant effects of the microwave treatment parameters, power (X1) and time (X2), are presented in Table 2. The determination coefficient  $R^2$  and significance ( $p < 0.05$ ) indicated a good fitting of the model for the maximum temperature of the gluten achieved during the treatment, moisture content, extractable gliadins,  $R_{max}$  and Ext (Table 2).

### 3.1. Effect of microwave treatment on gluten proteins extractability and primary structure

The different conditions of the microwave treatment of gluten showed a different impact on the maximum temperature achieved. The

temperature ranged from 41.85 °C for gluten 5 to 77.80 °C for gluten 6. The increased agitation of the water molecules and charged ions, when exposed to the microwaves, is the basis for the conversion of the electromagnetic energy of the microwave to thermal energy. In addition, the microwave allows faster heating than the conventional heating methods, through the direct penetration of the microwaves (Tang & Resurreccion, 2009). For the power used, the linear and the quadratic effects were found significant. The treatment time also impacted the gluten temperature in a linear fashion, being also observed a significant interaction between treatment time and power (Fig. 1A). Overall, the temperature increased with increasing power and with increasing treatment time as shown in Fig. 1A, but the increase in temperature with treatment time is more pronounced for the higher power levels applied.

The gluten moisture content was only linearly and significantly affected by the power of the microwave treatment, decreasing with increasing power level (Fig. 1B). The moisture content of the microwave treated glutes varied from 6.5 to 7.5% whereas the moisture content of the control gluten was  $8.29 \pm 0.06\%$ . In fact, the moisture content of all the microwave-treated samples decreased and a significant negative correlation was found between temperature and moisture content ( $r = -0.7535$ ,  $p = 0.0029$ ), showing that, as expected, the heat generated by the microwave radiation resulted in the dehydration of gluten. Similar results were found by Diraman (2010).

Both power level and treatment time significantly influenced the content of extractable gliadins, showing significant linear and quadratic effects without significant interaction between them (Fig. 1C). The maximum content of extractable gliadins measured by RP-HPLC was achieved using the conditions of power level and treatment time near the maximum values used. In fact, the extractable gliadins obtained in these conditions were significantly higher than those observed for the control gluten (Table 1). On the other hand, the microwave treatment did not affect the content of extractable glutenins, i.e. the protein extracted after reduction with dithiothreitol (DTT). Furthermore, no significant differences were observed for the microwave treated glutes under different power levels and treatment times. In order to evaluate if the microwave treatment affected the primary structure of gluten proteins, glutenins and gliadins extracted from the control gluten and microwave treated glutes were separated according to their molecular weight by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Their electrophoretic profiles are shown in Fig. 2.

The SDS-PAGE results showed that both glutenins and gliadins from the microwave treated glutes did not present any significant difference in their electrophoretic profiles and also in relation to the control gluten, including any increase or decrease in the number of protein bands. The same migration pattern observed for all the samples indicates that the primary structure of the gluten proteins was not modified which in turn means that the microwave treatment did not induce gluten hydrolysis under the tested conditions. These results are in accordance with the literature where it is stated that microwaving cannot change the primary structure of proteins because the energy of the chemical bonds is far superior to the quantum energy of the microwave (Han, Cai, Cheng, & Sun, 2018). The fact that the extractability of gliadins has been significantly altered without a change in their primary structure suggests that changes in their secondary and tertiary structure are involved in this observed increase in extractability (further discussed below).

### 3.2. Effect of microwave treatment on gluten functionality, secondary structure and macromolecular features of polymers

Fig. 3 shows the effect of microwave treatment on the  $R_{max}$  (A) and Ext (B) of the glutes.  $R_{max}$  of the microwave treated glutes ranged from  $64.63 \pm 0.58$  g to  $142.17 \pm 4.38$  g (Table 1). When compared to the control gluten ( $91.47 \pm 1.06$  g) it can be observed that the microwave treatment decreased the  $R_{max}$  in some treatments, while

**Table 1**  
General table gathering the experimental results. Differences in relation to the control are given in bold as \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ .

Parameter	Gluten						
	1	2	3	4	5	6	
Conditions Temperature (°C)	Power (W)	317.1	882.8	317.1	882.8	200	1000
	Time (s)	0.00	25.85	25.85	54.14	54.14	40.00
	RT	52.40 ± 0.56	63.20 ± 0.14	56.60 ± 0.56	75.80 ± 0.28	41.85 ± 0.91	77.80 ± 0.28
Moisture (g/100 g)	8.29 ± 0.06	<b>7.67 ± 0.06***</b>	<b>7.74 ± 0.06***</b>	<b>5.97 ± 0.03***</b>	<b>7.63 ± 0.08***</b>	<b>6.76 ± 0.03***</b>	
Gluten proteins quantification	Glutenins (g/100 g)#	11.76 ± 0.79	12.38 ± 1.05	11.28 ± 0.18	11.86 ± 1.05	11.53 ± 0.53	11.49 ± 0.23
	HMW-GS (g/100 g)#	2.71 ± 0.06	2.91 ± 0.25	2.74 ± 0.01	2.83 ± 0.15	2.72 ± 0.06	2.75 ± 0.07
	LMW-GS (g/100 g)#	9.05 ± 0.39	<b>10.58 ± 0.94***</b>	8.54 ± 0.42	9.03 ± 0.46	8.81 ± 0.25	8.74 ± 0.07
	Gliadins (g/100 g)#	49.97 ± 4.42	45.39 ± 1.41	49.62 ± 9.10	61.03 ± 3.77	55.85 ± 0.94	60.15 ± 0.41
	ω5-gliadins (g/100 g)#	4.15 ± 0.17	<b>3.45 ± 0.13***</b>	<b>3.49 ± 0.30***</b>	4.16 ± 0.18	3.79 ± 0.07	4.06 ± 0.18
ω1.2-gliadins (g/100 g)#	4.34 ± 0.17	<b>3.46 ± 0.11***</b>	<b>3.78 ± 0.09**</b>	4.14 ± 0.01	4.04 ± 0.10	4.33 ± 0.09	
Free SH (μmol/g)#	α/β-gliadins (g/100 g)#	26.54 ± 1.15	24.57 ± 2.18	26.99 ± 1.20	<b>33.83 ± 1.71***</b>	<b>30.56 ± 0.86***</b>	<b>32.99 ± 0.26***</b>
	γ-gliadins (g/100 g)#	14.93 ± 0.65	13.90 ± 1.24	15.51 ± 0.17	<b>18.90 ± 0.95***</b>	<b>17.45 ± 0.49***</b>	<b>18.77 ± 0.15***</b>
Rheology	$\gamma$	0.42 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.33 ± 0.02***	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.33 ± 0.02***
	$R_{max}$ (g)	91.47 ± 1.06	<b>105.01 ± 2.76**</b>	<b>137.75 ± 0.43***</b>	<b>142.17 ± 4.38***</b>	<b>79.07 ± 7.40**</b>	<b>103.25 ± 0.78**</b>
	Ext (mm)	59.64 ± 2.05	<b>44.29 ± 2.99***</b>	<b>62.77 ± 0.32</b>	<b>50.70 ± 0.44***</b>	<b>46.98 ± 0.23***</b>	<b>50.52 ± 2.62***</b>
	Mn (kDa)	7979.50 ± 560.10	7500.43 ± 265.72	7464.40 ± 409.70	6788.80 ± 559.76	7626.33 ± 353.55	7758.70 ± 448.03
FTIR	Mw (kDa)	32862.23 ± 3044.02	30691.00 ± 1635.65	<b>27536.10 ± 2029.01**</b>	<b>27705.30 ± 1535.58**</b>	<b>34461.80 ± 923.17</b>	<b>37460.15 ± 1269.25*</b>
	M (Avg)	5117.30 ± 118.78	5154.87 ± 6.30	4392.90 ± 234.40	5091.07 ± 291.48	4681.53 ± 334.59	5120.57 ± 98.02
	Mw/Mn	4.11 ± 0.10	4.09 ± 0.09	3.99 ± 0.31	<b>4.63 ± 0.24*</b>	4.10 ± 0.34	<b>4.74 ± 0.05**</b>
	Rw (nm)	65.77 ± 5.26	63.27 ± 3.33	62.40 ± 3.45	61.13 ± 2.19	60.47 ± 1.27	62.37 ± 0.32
SEC	Rz (nm)	100.33 ± 9.05	96.90 ± 7.34	97.50 ± 9.91	95.20 ± 5.93	93.93 ± 5.73	95.40 ± 3.77
	R (Avg)	62.90 ± 2.34	65.93 ± 1.16	65.90 ± 2.61	62.23 ± 1.37	66.07 ± 0.59	63.37 ± 1.62
	Rh (Q)	42.37 ± 1.19	42.57 ± 0.76	42.83 ± 1.07	41.83 ± 1.42	42.90 ± 0.70	42.37 ± 0.38
	Polymers mass fraction (%)	16.99 ± 0.82	15.82 ± 0.93	<b>19.53 ± 0.94*</b>	<b>10.84 ± 0.92***</b>	18.18 ± 0.70	<b>13.28 ± 1.43**</b>
UPP/EPP UPP/TPP (%) Glii/Glis	UPP/EPP	1.20 ± 0.18	<b>0.81 ± 0.02***</b>	<b>0.64 ± 0.17***</b>	<b>0.65 ± 0.19***</b>	<b>0.97 ± 0.03*</b>	<b>0.65 ± 0.03***</b>
	UPP/TPP (%)	54.26 ± 3.74	<b>44.83 ± 0.57***</b>	<b>38.45 ± 6.26***</b>	<b>40.49 ± 4.2***</b>	<b>49.14 ± 0.7</b>	<b>39.39 ± 1.12***</b>
	Glii/Glis	0.94 ± 0.13	<b>0.59 ± 0.05***</b>	<b>0.35 ± 0.18***</b>	<b>0.34 ± 0.19***</b>	<b>0.72 ± 0.08*</b>	<b>0.39 ± 0.03***</b>

(continued on next page)

Table 1 (Continued)

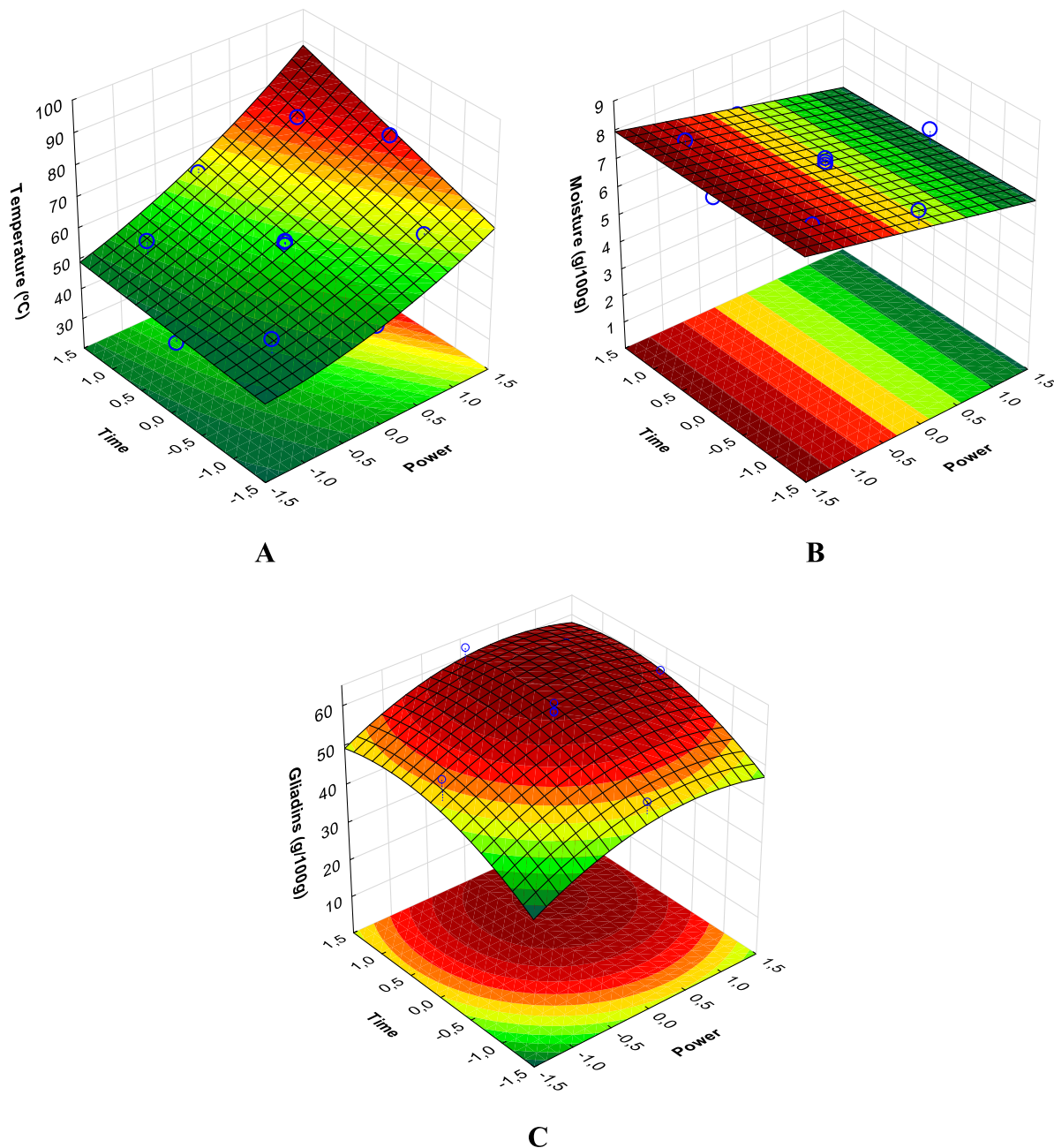
Parameter	Gluten						
	7	8	9	10	11	12	13
<b>Conditions</b>	Power (W)	600.00	600	600	600	600	600
	Time (s)	20.00	60.00	60.00	40.00	40.00	40.00
<b>Temperature (°C)</b>		50.80 ± 1.13	63.00 ± 0.28	57.75 ± 0.63	57.65 ± 0.21	58.70 ± 0.14	58.45 ± 0.63
	<b>Moisture (g/100 g)</b>	7.53 ± 0.07***	6.97 ± 0.03***	7.13 ± 0.08***	7.21 ± 0.03***	6.92 ± 0.08***	7.34 ± 0.07***
	<b>Gluten proteins quantification</b>	12.90 ± 1.22	11.69 ± 0.98	11.49 ± 0.52	11.14 ± 0.35	13.43 ± 0.22	12.67 ± 0.24
	HMW-GS (g/100 g)#	2.94 ± 0.09	2.80 ± 0.11	2.61 ± 0.02	2.64 ± 0.01	2.82 ± 0.09	2.91 ± 0.02
	LMW-GS (g/100 g)#	9.96 ± 0.59*	8.88 ± 0.46	8.87 ± 0.28	8.51 ± 0.19	10.60 ± 0.04***	9.77 ± 0.11*
	Glialdins (g/100 g)#	52.85 ± 11.03	63.63 ± 1.55**	58.84 ± 2.04	63.11 ± 1.23**	58.95 ± 4.35	60.73 ± 8.55
	ω5-glialdins (g/100 g)#	3.55 ± 0.47**	4.12 ± 0.02	3.96 ± 0.24	4.28 ± 0.03	4.04 ± 0.09	4.07 ± 0.42
	ω1,2-glialdins (g/100 g)#	3.69 ± 0.53**	4.20 ± 0.03	4.12 ± 0.17	4.28 ± 0.12	4.55 ± 0.22	4.41 ± 0.46
	α/β-glialdins (g/100 g)#	29.01 ± 1.72*	35.42 ± 1.82***	32.61 ± 1.02***	35.19 ± 0.80***	32.22 ± 0.14***	33.67 ± 0.39***
	γ-glialdins (g/100 g)#	16.61 ± 0.99**	19.89 ± 1.02***	18.15 ± 0.57***	19.36 ± 0.44***	18.14 ± 0.08***	18.58 ± 0.22***
	Free SH (μmol/g)#	5.36 ± 0.12	5.25 ± 0.06	5.12 ± 0.29	5.22 ± 0.24	5.42 ± 0.06	5.30 ± 0.07
	<b>Rheology</b>	R <sub>max</sub> (g)	102.89 ± 0.55**	99.41 ± 4.71	99.05 ± 0.44	107.77 ± 13.15***	100.75 ± 1.87**
		Ext (mm)	45.12 ± 2.32***	43.23 ± 5.05***	57.65 ± 0.97	59.58 ± 0.78	59.72 ± 0.89
	<b>FTIR</b>	1671 cm <sup>-1</sup> (%)	0.906 ± 0.008***	0.631 ± 0.001***	0.666 ± 0.08***	0.849 ± 0.011***	0.849 ± 0.011***
		1657 cm <sup>-1</sup> (%)	0.822 ± 0.007***	0.609 ± 0.001***	0.849 ± 0.011***	0.840 ± 0.011***	0.840 ± 0.011***
		1628 cm <sup>-1</sup> (%)	1.021 ± 0.009***	0.754 ± 0.001***	0.840 ± 0.011***	0.838 ± 0.017***	0.838 ± 0.017***
		1614 cm <sup>-1</sup> (%)	0.884 ± 0.011***	0.379 ± 0.003***	0.838 ± 0.017***	0.838 ± 0.017***	0.838 ± 0.017***
	<b>AF4</b>	v	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.33 ± 0.02***	0.38 ± 0.03	0.34 ± 0.04**
		Mn (kDa)	7793.53 ± 476.74	7042.90 ± 275.80	7495.93 ± 494.28	7944.65 ± 49.45	7703.67 ± 389.05
		Mw (kDa)	39103.10 ± 4126.69**	30784.25 ± 2922.95	35094.50 ± 2715.76	40768.00 ± 112.10**	37292.60 ± 1794.76*
		M (Avg)	5281.20 ± 552.53	4824.60 ± 13.50	5025.97 ± 208.03	5208.05 ± 66.75	5173.97 ± 533.58
		Mw/Mn	5.01 ± 0.22***	4.36 ± 0.24	4.68 ± 0.16*	5.13 ± 0.02***	4.86 ± 0.47**
		Rw (nm)	64.87 ± 3.42	62.17 ± 0.65	62.87 ± 4.19	64.50 ± 3.65	64.30 ± 3.92
		Rz (nm)	102.57 ± 7.62	96.77 ± 1.72	97.13 ± 8.26	100.17 ± 7.72	98.87 ± 9.61
		R (Avg)	66.00 ± 2.33	62.50 ± 2.77	63.87 ± 2.27	64.30 ± 2.35	64.97 ± 2.63
		Rh (Q)	42.37 ± 0.93	41.57 ± 0.06	42.30 ± 0.26	42.13 ± 0.47	42.47 ± 0.61
		Polymers mass fraction (%)	14.37 ± 1.71*	10.05 ± 0.55***	13.01 ± 2.26***	14.83 ± 0.84*	16.37 ± 0.85
	<b>SEC</b>	UPP/EPP	1.14 ± 0.13	1.09 ± 0.00	1.05 ± 0.05	0.89 ± 0.13**	1.1 ± 0.00
		UPP/TPP (%)	53.02 ± 2.93	52.13 ± 2.93	51.25 ± 1.15	46.99 ± 3.53*	46.58 ± 1.89*
		Glii/Glis	0.81 ± 0.16	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.08	0.56 ± 0.15***	0.62 ± 0.06**

# 14% humidity; RT - room temperature; HMW-GS - high molecular weight glutenin subunits; LMW - low molecular weight glutenin subunits; Free SH - free sulfhydryl groups; R<sub>max</sub> - maximum resistance to extension; Ext - total extensibility; v - slope; Mn - number average molar mass; Mw - weight average molar mass; M(Avg) - average molar mass; Mw/Mn - polydispersity index; Rw - gyration radius in mass; Rz - gyration radius; R (Avg) - average radius; Rh - hydrodynamic radius; UPP - unextractable polymeric protein; EPP - extractable polymeric protein; Glii - unextractable gliadin protein; Glis - extractable gliadin protein; TPP - Total polymeric protein.

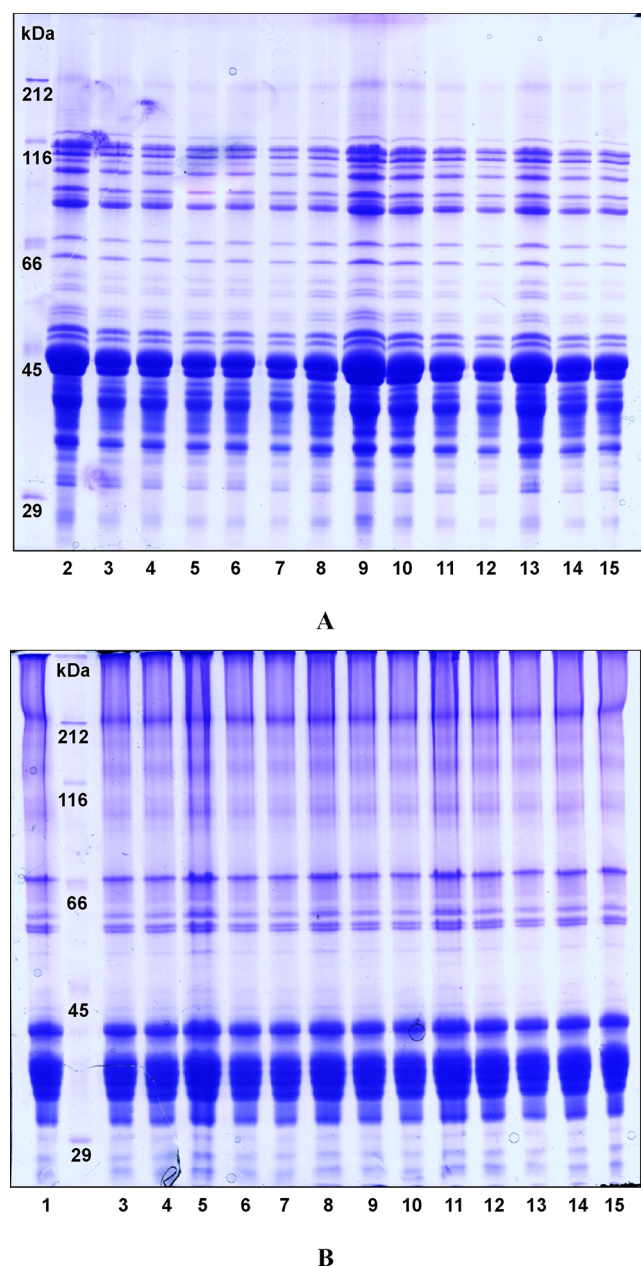
**Table 2**

Regression coefficients for the response surfaces of microwave treatment of wheat gluten. Significant values are given in bold as \*  $p \leq 0.05$ .

Source	Temperature	Moisture content	Gliadins	Glutenins	Free SH	R5 reactivity	R <sub>max</sub>	Ext
Intercept	<b>58.05*</b>	<b>7.12*</b>	<b>60.50*</b>	<b>11.92*</b>	<b>5.28*</b>	<b>271407.7*</b>	<b>100.60*</b>	<b>59.14*</b>
X <sub>1</sub> (b <sub>1</sub> )	<b>10.11*</b>	<b>-0.58*</b>	<b>2.91*</b>	-0.074	-0.099	1637.0	<b>18.06*</b>	<b>1.81*</b>
X <sub>1</sub> <sup>2</sup> (b <sub>1</sub> <sup>2</sup> )	<b>1.78*</b>	-0.055	<b>-2.83*</b>	-0.12	0.030	2159.0	-0.67	<b>-4.34*</b>
X <sub>2</sub> (b <sub>2</sub> )	<b>4.26*</b>	-0.10	<b>3.67*</b>	-0.56	0.076	-1047.1	<b>-5.11*</b>	<b>-2.17*</b>
X <sub>2</sub> <sup>2</sup> (b <sub>2</sub> <sup>2</sup> )	0.33	-0.027	<b>-2.71*</b>	0.27	-0.050	-544.1	4.33	<b>-6.63*</b>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> (b <sub>12</sub> )	<b>2.10*</b>	-0.043	1.41	0.42	-0.035	11872.0	<b>11.20*</b>	<b>-6.87*</b>
R <sup>2</sup>	0.925	0.732	0.721	0.434	0.356	0.0897	0.706	0.9325
R <sup>2</sup> (adjusted)	0.871	0.541	0.521	0.0304	0.000	0.000	0.496	0.884



**Fig. 1.** The response surfaces of the impact of power level and treatment time on the maximum temperature achieved (A), moisture content (B) and the content of extractable gliadins (C).



**Fig. 2.** Reduced and alkylated glutenin subunit patterns (A) and gliadin patterns (B) of gluten, control and microwave treated, analyzed by SDS-PAGE using 12% and 10% gels, respectively, for high molecular weight-glutenin subunits (HMW-GS), low molecular weight-glutenin subunits (LMW-GS),  $\omega$ - and  $\alpha/\beta/\gamma$ -type gliadins. Lane 2 (A) and Lane 1 (B), control gluten (Power 0 W, Time 0 s). Lane 3, microwave treated gluten 1 (317.1 W, 25.85 s). Lane 4, gluten 2 (882.8 W, 25.85 s). Lane 5, gluten 3 (317.1 W, 54.14 s). Lane 6, gluten 4 (882.8 W, 54.14 s). Lane 7, gluten 5 (200 W, 40 s). Lane 8, gluten 6 (1000 W, 40 s). Lane 9, gluten 7 (600 W, 20 s). Lane 10, gluten 8 (600 W, 60 s). Lane 11, gluten 9 (600 W, 40 s). Lane 12, gluten 10 (600 W, 40 s). Lane 13, gluten 11 (600 W, 40 s). Lane 14, gluten 12 (600 W, 40 s). Lane 15, gluten 13 (600 W, 40 s). Sizes (in kilodaltons) of protein molecular weight markers are shown (Lane 1-A and Lane 2-B).

increasing the  $R_{max}$  in others.

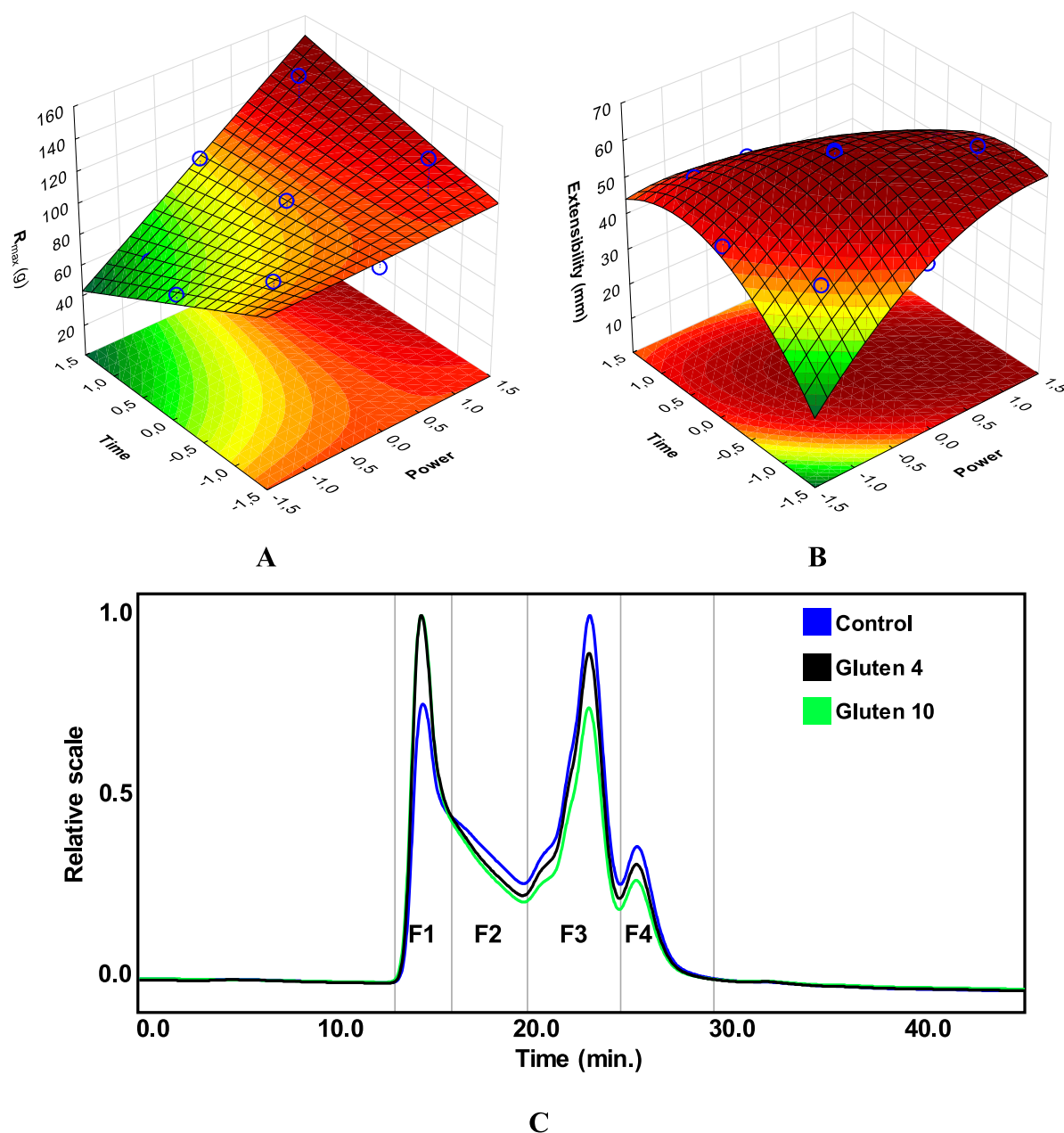
For the power levels used, the linear effect was found significant. The microwave treatment time did also influence the  $R_{max}$ , but in this case, only the quadratic effect was found significant. It was also observed a significant interaction between these two parameters (Fig. 3A). Overall, the maximum value of  $R_{max}$  was found when the gluten was treated at the maximum power level and treatment time, being

observed a significant correlation ( $r = 0.561$ ,  $p < 0.046$ ) with the maximum temperature achieved during the microwave treatment. These results are partially comparable with the results reported in (Warchalewski, Gralik, Grundas, Pruska-Kędzior, & Kędzior, 2011) who found that the microwave treatment of the gluten increases its elastic modulus.

For the Ext, the microwave treated glutes presented a significantly different value when compared to the control gluten (Table 1). On average, excluding the gluten 2 and the central points, there was a decrease in Ext. Gluten 2 was the only case where it was observed an increase in Ext (Table 1). For the power levels and treatment times used, both the linear and quadratic terms were significant, being also observed a significant interaction between both factors (Fig. 3b).

Disulphide bonds play a fundamental role in determining the polymeric structure and functional properties of gluten (Shewry, Halford, Belton, & Tatham, 2002). Regression analysis of the results obtained for the free sulfhydryl content of the microwave treated glutes did not allow to obtain a good model in the range of power levels (200–1000 Watt) and treatment times studied (20–60 s; Table 1). The free sulfhydryl content of the control gluten was  $5.19 \pm 0.12 \mu\text{mol/g}$  of protein. After microwave treatment, the free sulfhydryl content ranged from  $4.87 \pm 0.07$  to  $5.59 \pm 0.07 \mu\text{mol/g}$  of protein (Table 1). The glutes 3 and 5 presented a significantly higher content of free sulfhydryl groups when compared to control gluten. The gluten 2 presented a lower content of free sulfhydryl groups. Interestingly, the glutes 3 and 5 were those glutes with a lower  $R_{max}$  whereas gluten 2 was the gluten with the higher value of  $R_{max}$ . In fact, a significant negative correlation between the content of free sulfhydryl groups of glutes and the  $R_{max}$  ( $r = -0.727$ ,  $p < 0.005$ ) was observed. Nevertheless, the variation in the content of free sulfhydryl groups only explained 53% of the total variation observed for the  $R_{max}$  when gluten was treated by microwave. The generation of free radicals due to the absorption of the microwave energy by the polar groups of proteins can disrupt various interactions among protein molecules, including Van der Waals forces, electrostatic and hydrophobic interactions, H-bonding and disulphide bonds, modifying in this way the secondary and tertiary structure of proteins and their functional properties (Han et al., 2018).

In order to understand the effect of microwave treatment in the gluten secondary structure, the samples were analysed by FTIR. The deconvolution of the amide I band of control and microwave treated glutes, allowed to analyse the main secondary structure elements, namely the relative intensities at  $\sim 1671$  ( $\beta$ -turns),  $1657$  ( $\alpha$ -helix and random),  $1628$  ( $\beta$ -sheet) and  $1614 \text{ cm}^{-1}$  (intermolecular  $\beta$ -sheet) (Wellner et al., 2005). The relative intensities of the gluten main secondary structure elements are summarized in Table 1. The intensities of the bands were divided by the intensity of the band at  $1644 \text{ cm}^{-1}$  in order to avoid the normalization factor. The results clearly show that the secondary structure of gluten was modified by the microwave radiation. The  $\alpha$ -helix (band at  $1657 \text{ cm}^{-1}$ ) structures were significantly affected by microwave treatment. In fact, these structures are associated with the N- and C-terminal regions of the high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) that contain cysteine residues (Li, Dobraszczyk, Dias, & Gil, 2006). Considering that the heating generated by the microwave treatment promotes sulfhydryl-disulphide interchange reactions, the decrease in the relative abundance of these secondary structures suggests a different arrangement of the disulphide bonds in the microwave treated glutes. Furthermore, the relative intensity of the  $\beta$ -turn structures ( $1671 \text{ cm}^{-1}$ ) was also affected by the microwave treatment, but the effect, in this case, seems to be more random between the samples treated by the microwave with the different power levels and treatment times. It was proposed that the  $\beta$ -turn structures of the HMW-GS are organized in a regular  $\beta$ -spiral structure (Shewry et al., 2002). Thus, the decrease or increase in the relative intensities of the  $\beta$ -turn structures observed for the samples treated with the microwave in relation to the control gluten suggests the occurrence of changes in the  $\beta$ -spiral structure and/or in its proportion (Wellner



**Fig. 3.** The response surfaces of the impact of power level and treatment time on the maximum resistance to extension ( $R_{max}$ ; A) and extensibility (Ext; B) of glutes. SE-HPLC protein profile of extractable proteins from control gluten, gluten 4 and gluten 10 at 214 nm (C). The elution profile was divided into four main peaks corresponding to polymeric glutenin proteins (F1s + F2s), gliadins (F3) and functional proteins (F4).

et al., 2005). Considering the importance of this structure for the elastic behavior of gluten (Humphris et al., 2000; Tatham, Mifflin, & Shewry, 1985), we can state that in addition to the changes promoted by the microwave treatment at the level of tertiary structure imposed by the disulphide bonds, the changes in the secondary structure of the gluten proteins may also have an important role in defining the rheological and functional properties of the microwave treated gluten. The modification of the gluten proteins induced by the microwave radiation is also confirmed by the change in abundance and molecular features of the polymers determined by asymmetrical flow field-flow fractionation (Table 1). The microwave treatment of gluten induced changes in the molecular weight distribution of the polymeric aggregates, which was mainly substantiated by the weight-average molar mass (Mw) and the dispersity (Mw/Mn) (Ribeiro et al., 2019). The Mw and dispersity of the polymeric aggregates significantly increased for the majority of the microwave treated glutes, namely glutes 6, 7, 10, 11 and 12, and 3,

6, 7, 9, 10, 11 and 12, respectively, also increasingly on average for both parameters. The observed changes in the molecular distribution of the glutenin polymers were accompanied by a significant decrease in the aggregate mass fraction percentage showing disruption of weak interactions (such as hydrophobic, Van der Waals and hydrogen interactions) between the aggregated polymers. In addition, considering the absence of significant effects on the content of free sulfhydryl groups, the changes in Mw were not due to glutenin polymerization and/or depolymerization but due to protein disaggregation.

To better understand the effect of microwave treatment on the functionality of gluten and on the macromolecular features of proteins, the SDS protein solubility was studied using SEC. Parameters such as UPP/EPP, UPP/TPP and Glii/Glis which play a key role in the formation of polymeric aggregates and the arrangement of the gluten network were determined (Table 1 and Fig. 3C).

The microwave treatment significantly modified the 2% SDS

solubility of gluten proteins. UPP/EPP, UPP/TPP, and Glii/Glis parameters decreased for all the microwave treated samples in relation to the control gluten. The UPP/EPP ratio decreased from 1.20 to 0.65 for the control gluten and microwave treated gluten 6 (where the higher temperature was achieved), respectively. The UPP/TPP (%) decreased from 54.26% to 39.39% for the control gluten and microwave treated gluten 6, respectively. These changes were due to a disaggregation phenomenon of the polymeric aggregates. The most affected fraction was the unextractable polymeric protein, namely fraction 2 of the unextractable glutenin (Table 1). At the same time, the microwave treatment significantly modified the unextractable gliadins to extractable gliadins ratio (Glii/Glis). As expected, gliadin solubility increased significantly with treatment. The Glii/Glis ratio decreased from 0.94 to 0.39 for the control gluten and microwave treated gluten 6, respectively. These decreases mean that the interactions between gliadin and polymeric aggregates were disrupted leading to the changes observed in the molecular weight distribution of the polymeric aggregates.

### 3.3. Effect of microwave treatment on gluten potential celiac-immunogenicity

The effects of power level and treatment time of microwave treatment on the amount of potential celiac-toxic epitopes released after simulated gastric and intestinal digestion were evaluated and are reported in Table 1 and Fig. 4. No significant linear, quadratic and interaction effects of the factors analysed were observed. Nevertheless, it should be noted that none of the microwave treated samples showed on average an inferior content of toxic epitopes than the control gluten. The values obtained ranged from  $227.5 \pm 7.3$  g/kg of the control gluten to  $298.8 \pm 3.5$  g/kg of the microwave treated gluten 12 (Table 1 and Fig. 4). These results clearly show that despite the significant differences observed in relation to the gluten secondary structure and polymeric macromolecular features, the microwave treatment cannot decrease the amount of potential celiac-toxic epitopes released after simulated gastric and intestinal digestion. These results are partially in accordance with those of Leszczynska et al. (2003) and Gianfrani et al. (2017) who observed that the microwave treatment didn't reduce the celiac-immunogenicity of gliadins from a commercial preparation and from *T. durum* and *T. aestivum* soaked kernels, respectively. Nevertheless, Gianfrani et al. (2017) observed a decrease in the R5 reactivity when the undigested alcohol-soluble proteins obtained from the microwave treated kernels were analysed using the R5-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which contrasts with their results from the G12 antibody-based ELISA, mass spectrometry-based proteomics and *in vitro* assay with T-cells of celiac subjects, where

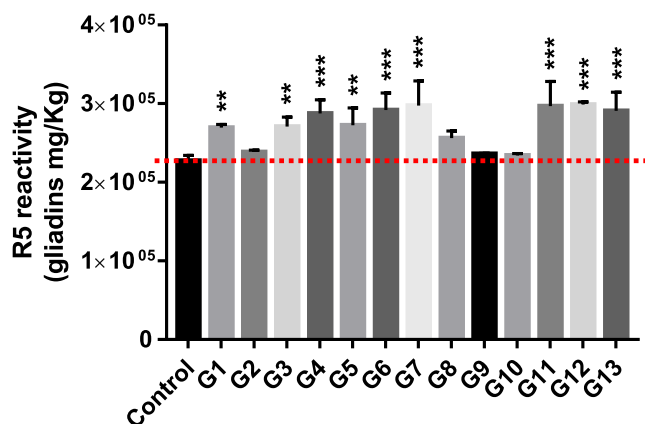


Fig. 4. R5 reactivity of the different microwave treated glutes and control measured after peptic and tryptic digestion. Differences in relation to the control are given as \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . Control – control gluten; G1 to G13 – microwave treated gluten. For more details on G1 to G13, please consult Table 1.

no differences in toxicity between the microwave treated and control kernels were found. In our work we used the peptic-tryptic digests of the microwave treated glutes and the R5-competitive ELISA format for measuring the potential celiac-immunotoxicity of the microwave treated gluten (Kahlenberg et al., 2006; Osman et al., 2001) and we observed that there was an average increase in the gluten toxicity (+20%) after microwave treatment. On the other hand, Lamacchia et al. (2016) reported that the microwave treatment of wheat kernels, a mixture of soft and durum wheats, at 1000 Watt during 2 min reduced the cross-reactivity with the R5 antibody by 99% which is in accordance with the above-mentioned results reported by Gianfrani et al. (2017) when using the R5 antibody without previous proteolysis. Both results seem to clearly point out that the measurement of the potential immunogenicity of gluten using antibody assays should be performed with previously hydrolysed material. The increase in celiac-immunotoxicity observed for the microwave treated gluten (maximum 31%) can be explained by the disaggregation of the gluten proteins as discussed previously (Table 1) where it was observed a significant increase in the SDS-extractable gluten proteins, including gliadins, in the microwave treated glutes, nevertheless, other factors seem to be also affecting the release of the R5 reactive epitopes by the proteases as there was observed a significant Spearman correlation between the amount of R5 reactive epitopes and the content of free sulfhydryl groups ( $\rho = 0.560$ ,  $p < 0.05$ ) and extractable HMW-GS ( $\rho = 0.534$ ,  $p < 0.05$ ). These changes can render a gluten protein structure more accessible to proteases.

## 4. Conclusions

The results obtained in this work clearly shows that the microwave treatment of gluten proteins cannot decrease its celiac-related toxicity, on the contrary, it can render the gluten with a potential increased immunotoxicity for people who suffer from celiac disease. This can be due to an increase in gluten digestibility due to the disaggregation phenomenon observed with the microwave treatment. Nevertheless, from a functional point of view, microwave treatment can be an efficient treatment to increase the  $R_{max}$  in a proper combination of treatment time and power level and can be used advantageously for the production of vital gluten. This increase in  $R_{max}$  is due to a decrease in the content of free sulfhydryl groups and rearrangement of disulphide bonds as well as an increase in the abundance of polymers. Besides the sulfhydryl-disulphide interchange reaction, the changes in the secondary structure of gluten proteins are also important to explain this effect.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support provided by the European Investment Funds FEDER/COMPETE/POCI under Project POCI-01-0145-FEDER-007728 and Funds from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) to CQ-VR (PEst-OE/QUI/UI0616/2014).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124986>.

## References

- AACC AACC Method 44-19.01. Moisture - Air-Oven Method, Drying at 135° 1999.
- Benjamini, Y., Krieger, A. M., & Yekutieli, D. (2006). Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. *Biometrika*, 93(3), 491-507.
- Bourekoua, H., Benatallah, L., Zidoune, M. N., & Rosell, C. M. (2016). Developing gluten



- free bakery improvers by hydrothermal treatment of rice and corn flours. *Lwt-Food Science and Technology*, 73, 342–350.
- Capriles, V. D., dos Santos, F. G., & Areas, J. A. G. (2016). Gluten-free breadmaking: Improving nutritional and bioactive compounds. *Journal of Cereal Science*, 67, 83–91.
- Carceller, J. L., & Aussenac, T. (1999). Accumulation and changes in molecular size distribution of polymeric proteins in developing grains of hexaploid wheats: Role of the desiccation phase. *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(4), 301–310.
- Chan, K. Y., & Wasserman, B. P. (1993). Direct colorimetric assay of free thiol-groups and disulfide bonds in suspensions of solubilized and particulate cereal proteins (Vol 70, Pg 22, 1993). *Cereal Chemistry*, 70(2) 240–240.
- Diraman, H. (2010). Effect of microwaves on technological and rheological properties of Suni-Bug (*Eurygaster spp*) damaged and undamaged wheat flour. *Food Science and Technology Research*, 16(4), 313–318.
- Gessendorfer, B., Koehler, P., & Wieser, H. (2009). Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(6), 1721–1728.
- Gianfrani, C., Mamone, G., Gatta, B. I., Camarca, A., Stasio, L. D., Maurano, F., ... Luccia, A. D. (2017). Microwave-based treatments of wheat kernels do not abolish gluten epitopes implicated in celiac disease. *Food and Chemical Toxicology*, 101, 105–113.
- Gianfrani, C., Siciliano, R. A., Facchiano, A. M., Camarca, A., Mazzeo, M. F., Costantini, S., ... Rossi, M. (2007). Transamidation of wheat flour inhibits the response to gliadin of intestinal T cells in celiac disease. *Gastroenterology*, 133(3), 780–789.
- Gozé, P., Rhazi, L., Lakhali, J., Jacolot, P., Pauss, A., & Aussenac, T. (2017). Effects of ozone treatment on the molecular properties of wheat grain proteins. *Journal of Cereal Science*, 75, 243–251.
- Gupta, R. B., Khan, K., & Macritchie, F. (1993). Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in the quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science*, 18(1), 23–41.
- Han, Z., Cai, M.-J., Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 1–9.
- Humphris, A. D. L., McMaster, T. J., Miles, M. J., Gilbert, S. M., Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (2000). Atomic force microscopy (AFM) study of interactions of HMW subunits of wheat glutenin. *Cereal Chemistry*, 77(2), 107–110.
- Kahlenberg, F., Sanchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalova, H., Mendez, E., & Mothes, T. (2006). Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research and Technology*, 222(1–2), 78–82.
- Kieffer, R., Schurer, F., Kohler, P., & Wieser, H. (2007). Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *Journal of Cereal Science*, 45(3), 285–292.
- Lamacchia, C., Landriscina, L., & D'Agello, P. (2016). Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food Chemistry*, 197(Pt A), 634–640.
- Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *Lancet*, 391(10115), 70–81.
- Lemelin, E., Aussenac, T., Violleau, F., Salvo, L., & Lein, V. (2005). Impact of cultivar and environment on size characteristics of wheat proteins using asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering. *Cereal Chemistry*, 82(1), 28–33.
- Leszczynska, J., Łącka, A., Szemraj, J., Lukamowicz, J., & Zegota, H. (2003). The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *European Food Research and Technology*, 217(5), 387–391.
- Li, W., Dobraszczyk, B. J., Dias, A., & Gil, A. M. (2006). Polymer conformation structure of wheat proteins and gluten subfractions revealed by ATR-FTIR. *Cereal Chemistry*, 83(4), 407–410.
- Osman, A. A., Uhlrig, H. H., Valdes, I., Amin, M., Mendez, E., & Mothes, T. (2001). A monoclonal antibody that recognizes a potential toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13(10), 1189–1193.
- Pyle, G. G., Paaso, B., Anderson, B. E., Allen, D. D., Marti, T., Li, Q., ... Gray, G. M. (2005). Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(7), 687–694.
- Qu, C., Wang, H., Liu, S., Wang, F., & Liu, C. (2017). Effects of microwave heating of wheat on its functional properties and accelerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3699–3706.
- Ribeiro, M., Nunes, F. M., Guedes, S., Domingues, P., Silva, A. M., Carrillo, J. M., ... Igrejas, G. (2015). Efficient chemo-enzymatic gluten detoxification: Reducing toxic epitopes for celiac patients improving functional properties. *Scientific Reports*, 5, 18041.
- Ribeiro, M., Picascia, S., Rhazi, L., Gianfrani, C., Carrillo, J. M., Rodriguez-Quijano, M., ... Nunes, F. M. (2018). In situ gluten-chitosan interlocked self-assembled supramolecular architecture reduces T-cell-mediated immune response to gluten in celiac disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(23), e1800646.
- Ribeiro, M., Picascia, S., Rhazi, L., Gianfrani, C., Carrillo, J. M., Rodriguez-Quijano, M., ... Nunes, F. M. (2019). Effect of in situ gluten-chitosan interlocked self-assembled supramolecular architecture on rheological properties and functionality of reduced celiac-toxicity wheat flour. *Food Hydrocolloids*, 90, 266–275.
- Ribeiro, M., Rodriguez-Quijano, M., Nunes, F. M., Carrillo, J. M., Branlard, G., & Igrejas, G. (2016). New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes. *Food Chemistry*, 213, 8–18.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., & Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357(1418), 133–142.
- Singh, N. K., Shepherd, K. W., & Cornish, G. B. (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 14(3), 203–208.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Perera, C. O., & Waterhouse, G. I. N. (2012). Exploring the interactions between blackcurrant polyphenols, pectin and wheat biopolymers in model breads; a FTIR and HPLC investigation. *Food Chemistry*, 131(3), 802–810.
- Tang, J., & Resurreccion, F. P. (2009). Electromagnetic basis of microwave heating. In M. W. Lorence, & P. S. Pesheck (Eds.). *Development of packaging and products for use in microwave ovens* (pp. 3–38e). Woodhead Publishing.
- Tatham, A. S., Mifflin, B. J., & Shewry, P. R. (1985). The beta-turn conformation in wheat gluten proteins – Relationship to Gluten Elasticity. *Cereal Chemistry*, 62(5), 405–412.
- Tonutti, E., & Bizzaro, N. (2014). Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmunity Reviews*, 13(4–5), 472–476.
- Tuhumury, H. C. D., Small, D. M., & Day, L. (2014). The effect of sodium chloride on gluten network formation and rheology. *Journal of Cereal Science*, 60(1), 229–237.
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., & Polzonetti, V. (2016). Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin Nutr*, 35(6), 1236–1241.
- Warchalewski, J. R., Gralik, J., Grundas, S., Pruska-Kędzior, A., & Kędzior, Z. (2011). *Changes in microwave-treated wheat grain properties. Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials*. IntechOpen.
- Wellner, N., Mills, E. N., Brownsey, G., Wilson, R. H., Brown, N., Freeman, J., ... Belton, P. S. (2005). Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6(1), 255–261.
- Wieser, H., Antes, S., & Seilmeier, W. (1998). Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry*, 75(5), 644–650.
- Zannini, E., Kingston, W., Arendt, E. K., & Waters, D. M. (2013). Technological challenges and strategies for developing low-protein/protein-free cereal foods for specific dietary management. *Food Research International*, 54(1), 935–950.

*Article 2:*

*Impact of Instant Controlled Pressure Drop  
(DIC) Treatment on Chemical, Functional  
and Immunological Properties of Wheat  
Gluten*



# Impact of Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Treatment on Chemical, Functional and Immunological Properties of Wheat Gluten

Hamida Mahroug<sup>1,2</sup> · Leila Benatallah<sup>1</sup> · Krisztina Takács<sup>4</sup> · Haroun Bouab<sup>5</sup> · Mohammed Nasreddine Zidoune<sup>2,3</sup> · Karim Allaf<sup>2</sup>

Received: 28 May 2019 / Accepted: 15 November 2019  
© King Fahd University of Petroleum & Minerals 2020

## Abstract

Instant controlled pressure drop DIC technology is a thermo-mechanical treatment method that combines both mechanical and heat impacts of saturated steam pressure over a short period of time. This study aims to investigate the effect of DIC (100–165 °C for 20–60 s) on chemical, functional and immunological properties of wheat gluten powder using response surface methodology. Chemical properties were studied by Fourier transform infrared spectroscopy, thiol measurement and gel electrophoresis. Protein solubility, emulsifying capacity and foaming ability were evaluated as functional properties. Immunological properties were studied by indirect ELISA. After DIC treatment, wheat gluten became rigid which was due to a significant increase in  $\beta$ -structures. Significant loss of  $\alpha$ -helixes and a significant increase in intermolecular  $\beta$ -sheet and the rearrangement of disulfide bonds indicated the denaturation of wheat gluten protein. However, the primary structure was not affected. DIC treatment altered the functional properties. The lowest protein solubility, emulsifying capacity and foaming ability were obtained at the highest DIC treatment conditions (165 °C, 60 s). The immunoreactivity of celiac IgA antigliadin antibodies of DIC wheat gluten depended on the individual patient characteristics. However, we note that the immunoreactivity has increased overall.

**Keywords** DIC treatment · Wheat gluten · Functional properties · Secondary structure · Immunoreactivity

✉ Karim Allaf  
kallaf@univ-lr.fr

- <sup>1</sup> Laboratoire de Génie Agro-Alimentaire GeniAAI, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, BP 325 Route de Ain El Bey, Constantine, Algeria
- <sup>2</sup> Laboratory of Engineering Science for Environment LaSIE UMR 7356 CNRS, La Rochelle University, 23 Avenue Albert Einstein, BP 33060, 17031 La-Rochelle, France
- <sup>3</sup> Laboratoire de Nutrition et de Technologies Alimentaires LNTA, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires INATAA, Université Frères Mentouri Constantine 1, BP 325 Route de Ain El Bey, Constantine, Algeria
- <sup>4</sup> Department of Biology, Food Science Research Institute, National Agricultural Research and Innovation Centre NARIC, Herman O. Str. 15, Budapest, Hungary
- <sup>5</sup> Faculté de Médecine, Université Salah Boubendir Constantine, 'B' 72 Ali Mendjeli Nouvelle Ville, Constantine, Algeria

## 1 Introduction

Wheat is the second most widely produced cereal in the world, known for its adaptability, high yields and nutritional value. In several parts of the world, including North Africa, wheat and its derivatives are considered staple foods and continue to rise in production and consumption with the growing population [1].

One of the key features that contribute to the widespread use of wheat is the viscoelasticity of its flour dough, a unique property that allows it to be processed into bread, baked goods, pasta and other food items. Viscoelasticity is the result of the formation of a three-dimensional network interconnected by the disulfide bonds that are present in gluten; the complex protein composed of gliadin and glutenin [2]. Numerous functional properties of wheat gluten, such as solubility, fat emulsification, gelation and foaming, have caused an enormous diversity of applications. In fact, gluten is often used in the preparation of fruit puree and soy sauce, in meat products and monosodium glutamate



manufacturing [3]. Despite the ubiquity of wheat gluten in our diet, it poses a health risk to a minority of people in the form of celiac disease, allergies food or non-celiac sensitivity [4]. Celiac disease (CD), or wheat gluten intolerance, is an immune-mediated enteropathy manifested in genetically predisposed people and induced by the consumption of the prolamin of wheat, oat, barley and rye [5]. It is characterized by malabsorption resulting from inflammatory injury to the mucosa of the small intestine [6]. CD can occur at any age and affects approximately 1% of the population [7]. The current treatment of celiac disease is a lifelong exclusion of gluten in the diet of the affected patients [8].

The gluten-free diet (GFD) is effective in relieving symptoms of CD and normalizing the antibodies in the intestinal mucosa. However, it carries severe limitations due to the risk of contamination of foods or drugs with gluten, high cost, unavailability of gluten-free products and social marginalization of celiac disease patients [9]. Furthermore, this diet is poor in micronutrients and contributes to deficiencies, including iron, folic acid, vitamin B12 and vitamin D [10].

Physical treatments are currently used to modify the immunological properties of wheat gluten. It was shown that pulsed light and microwave irradiation decrease significantly the immunoreactivity of wheat gluten [11, 12]. Instant controlled pressure drop technology (French: *Détente Instantanée Contrôlée*-DIC), as the name suggests, is a thermo-mechanical treatment method that combines both mechanical and heat impacts of saturated steam pressure over a short period of time.

The DIC process is carried out into two main steps. The first step is based on heating through the use of dry saturated steam pressure from 100 to 700 kPa. The steam condensing on the surface of product results in a quick increase in the product temperature up to a level usually defined in the range of 100–165 °C and thermal treatment time between 5 and 60 s. The objective is to ensure homogeneous heat temperature and water repartition within the product. The second step is based on an abrupt pressure drop toward a vacuum (4–5 kPa) with a very high decompression rate (higher than 500 kPa s<sup>-1</sup>) which is generally maintained for 5–20 s [13, 14].

Very few studies have addressed the effects of DIC on food proteins immunoreactivity. The overall findings appear to suggest that DIC has different effects on protein immunoreactivity depending on the nature of the protein and the treatment conditions [15–18]. Lupin and soybean proteins treated by DIC at 159 °C for 3 min have been shown to completely lose their binding ability of IgE [15–17]. In chickpea and lentil treated at 132.5 °C and 159 °C for 3 min and whey protein treated at 144 °C and 159 °C for 25 s, DIC induced partial loss of IgE-binding ability, whereas, in roasted peanut proteins treated at 132.5 °C and 159 °C for 1 and 3 min and

milk caseins treated at 144 °C for 25 s, the immunoreactivity was shown to have increased [17, 18].

In the present study, the possibility of using DIC to reduce or abolish the immunoreactivity of wheat gluten as an alternative to a gluten-free diet was investigated. As far as we know, there are no such studies examining the impact of DIC on chemical, functional and immunological properties of wheat gluten.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Extraction of Wheat Gluten

For extraction of wheat gluten, 300 g of flour was first mixed with 160 ml of NaCl 0.4 M for 5 min in a kneading machine. After 8-min resting time, the dough was washed with a NaCl solution (0.4 M, 3 L) until viscoelastic gluten was formed. Then, the crude gluten was again washed with deionized water to remove NaCl [19]. Finally, the wet gluten was dried, ground and sieved to obtain a homogeneous powder.

### 2.2 DIC Treatment

DIC treatment was carried out by a laboratory-scale DIC unit (provided by ABCAR-DIC Process, La Rochelle, France). Briefly, the gluten powder was placed in a processing chamber and exposed to a dry saturated steam pressure (up to 100 kPa) at high temperature (up to 100 °C) over a relatively short time (few seconds to some minutes). This high temperature–short time was followed by an instant pressure drop toward a vacuum at about 5 kPa. This abrupt pressure drop, at a rate  $\Delta P/\Delta t$  higher than 500 kPa/s, simultaneously provokes an autovaporization of a part of the water in the product and instantaneously cools the products, which stops thermal degradation [20].

### 2.3 Experimental Design

In this study, response surface methodology (RSM) with central composite design of experiments (CC-DoE), the most popular of all second-order designs, was applied to reduce experimental runs and to determine the significance of the factors. This DoE is composed of three portions:  $2k$  factorial portion ( $-1, +1$ ),  $2k$  axial portion ( $-\alpha, +\alpha$ ) and  $n_0$  center points replicates (0, 0). In the actual case, two factors of temperature ( $X_1$ ) and processing time ( $X_2$ ) were the independent variables ( $k=2$ ). Thus, the DoE total number was  $n=2^2+2*2+5=13$  runs. Therefore, the five levels for each factor were  $-\alpha, -1, 0, +1$  and  $+\alpha$  corresponded, respectively, to 100, 109.5, 132.5, 155.5 and 165 °C for temperature and 20, 25.9, 40, 54.1 and 60 s for time treatment. The CC-DoE matrix was made with Minitab software (version 13.31, Minitab Inc., USA). The

responses were expressed in terms of the factors according to the following equation:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

where  $Y$  is response variable, and  $X_1$ ,  $X_2$  are independent variables, processing temperature and time, respectively.  $b_0$  is constant coefficient of intercept,  $b_1$  and  $b_2$  are regression linear coefficients,  $b_{11}$  and  $b_{22}$  are regression quadratic coefficients, and  $b_{12}$  is interaction regression coefficient.

## 2.4 Human Sera

Individual serum samples from three diagnosed celiac disease patients (CD) were collected from Ibn Sina Clinic (Constantine, Algeria). Untreated CD patients were numbered P1 (female aged 24), P2 (female aged 7) and P3 (male aged 17). They showed digestive and extra-digestive symptoms and positive IgA antibodies toward gliadin ( $> 25$  RU/ml), tissular transglutaminase tTG ( $> 20$  RU/ml) and endomysium ( $> 1/10$ ). These patients were selected on the basis of their high IgA antigliadin antibodies concentration ( $> 2000$  RU/ml). The sera were stored at  $-20$  °C until use.

## 2.5 Determination of Changes in Secondary Structure

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to study the impact of DIC on wheat gluten secondary structure. All samples, gluten control and DIC-treated gluten samples, were analyzed by FTIR. FTIR spectra were recorded between  $4000$  and  $400$   $\text{cm}^{-1}$  with 32 scans and  $8$   $\text{cm}^{-1}$  resolution against the background using an IR Affinity-1S Fourier transform infrared spectrophotometer (SHIMADZU, IZASA Scientific, France) equipped with a single-reflection diamond attenuated total reflection (ATR) crystal and a mercury–cadmium–telluride (MCT) detector. Each sample was placed on the surface of the ATR crystal at room temperature. The measurement was repeated five times to get the average value.

The spectra were manually corrected with a linear baseline in the LabSolutions IR software. Structural analysis of the amide I ( $1600$ – $1700$   $\text{cm}^{-1}$ ) was conducted using Origin software (version 8.0724 PRO, Origin Lab Corporation, USA) and peak-fit software (version 4.6, USA). The baseline correction and derivation were performed with Origin software. The spectra were deconvoluted and curve fitted to obtain percentages of secondary structure components using peak-fit software.

### 2.5.1 Determination of Free Thiol Content

Colorimetric measurements of free thiol content were taken using DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid)

according to the reported method of Jansens et al. [21] slightly modified. A dispersion of the samples (2 mg/ml) was prepared in sample buffer [ $0.05$  mol  $\text{L}^{-1}$  phosphate buffer (pH 6.5) containing 2% (w/v) SDS,  $3.0$  mol  $\text{L}^{-1}$  urea and  $1.0$  mmol  $\text{L}^{-1}$  EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)]. The dispersion was left for 1 h with intermittent vortexing every 15 min. Then,  $400$   $\mu\text{l}$  of DTNB reagent [0.1% (w/v) in sample buffer] was added, incubated for 45 min with intermittent vortexing and centrifuged at  $3000 \times g$  at room temperature for 10 min. The supernatant was collected, filtered ( $0.45$ - $\mu\text{m}$  RC, Millipore), and the absorbance of the filtrate was taken at 412 nm using UV spectrometer (Secomam, Prim, France). The absorbance value was divided by the molar extinction coefficient of 13,600 to obtain the thiol content, expressed as  $\mu\text{mol/g}$  of protein.

### 2.5.2 Electrophoresis Separation

**2.5.2.1 Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)** SDS-PAGE was performed according to Laemmli protocol following the Instruction Manual of Mini-PROTEAN 3Cell (BioRad) using 6%/12% stacking/resolving gel. Three milligrams of each sample, gluten control and DIC-treated gluten, was extracted by  $300$   $\mu\text{l}$   $2 \times$  Laemmli sample buffer (BioRad)-contained  $\beta$ -mercaptoethanol and then was heated in boiling water for 3 min, and the same amount ( $4$ – $4$   $\mu\text{l}$ ) of samples was loaded onto the gel. The separation was achieved at 200 V for approximately 65 min at room temperature. After electrophoresis, the separated proteins were fixed on a gel with 20% TCA (trichloroacetic acid) for 20 min, and then, the gel was soaked in acetic acid/ethanol washing liquid 3 times for 10 min. Staining was performed with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Reanal, Hungary). The background staining was removed by 10% acetic acid. Imaging of the gels was carried out with BioRad Gel Doc 2000 system.

### 2.5.3 Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2D-PAGE)

Two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) was performed according to Laemmli [22] and Hajós et al. [23]. Only gluten control and gluten samples DIC treated at the same time (40 s) and different processing temperatures (100, 132.5 and 165 °C) were analyzed by 2D electrophoresis. The first dimension, the isoelectric focusing, was run in the immobilized pH gradient (IPG strip, 7 cm) strip with pH range of 3–10 using an isoelectric focusing chamber (PROTEAN IEF Cell, BioRad). A quantity of 0.6 mg dry matter of each sample was used for each strip. It was dissolved (rehydrated) in 250  $\mu\text{l}$  rehydration buffer ( $8$  mol  $\text{l}^{-1}$  urea, 1% CHAPS,  $0.02$  mol  $\text{l}^{-1}$  DTT) with  $600$   $\mu\text{l}$  mineral oil (BioRad) surface top put into a i12 rehydration/equilibration tray (BioRad).



Then, the isoelectric focusing (IEF) was carried out by linearly increasing voltage from 250 to 24,000 Vh. After reaching the equilibrium, each strip was incubated in 1.5 ml equilibration solution [first for 15 min at room temperature in I. Buffer: 6 mol L<sup>-1</sup> urea, 1.5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.8), 2% w/v DTT, 2% SDS, 20% glycerol and secondly for 15 min at room temperature in II. Buffer: 6 mol L<sup>-1</sup> urea, 1.5 mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.8), 2.5% w/v iodoacetamide, 2% SDS, 20% glycerol] with gentle shaking before being transferred to the second dimension.

In the second dimension, the separation of proteins was carried out by SDS-PAGE in thin layer gels (75 mm\_83 mm\_1.5 mm) by using a Mini-PROTEAN II cell (BioRad). The total acrylamide content of the running gel was 12%. Imaging of the gels was carried out with BioRad Gel Doc 2000 system.

## 2.6 Determination of Functional Properties

### 2.6.1 Determination of Protein Solubility

Protein solubility ( $S\%$ ) of wheat gluten control and DIC-treated gluten samples was investigated according to the method of Casella and Whitaker [24] with some modifications. Solubility was performed at pH 3 at 1% (w/v) concentration in distilled water. The gluten protein and distilled water were first stirred up in glass beaker (50 ml) for 5 min to obtain a pre-mixed blend. Then, the pH values of suspensions were adjusted to 3 with 0.5 mol l<sup>-1</sup> HCl and stirred at room temperature for 1 h on a magnetic stirrer. They were centrifuged at 1640×g for 15 min at room temperature, and the supernatant was filtered through a Whatman No. 1 filter paper to obtain a clear filtrate. The amount of soluble protein in the filtrate was determined by the method of Lowry et al. [25] with bovine serum albumin as standard.

The solubility  $S\%$  was calculated with the following equation:

$$S\% = \frac{C}{C_0} \times 100$$

where  $C$  and  $C_0$  are the protein concentrations of DIC-treated gluten and untreated gluten, respectively.

### 2.6.2 Determination of Emulsifying Capacity

Emulsifying capacity (EC) of wheat gluten control and DIC-treated gluten samples was determined according to the method of Yasumatsu et al. [26]. EC of the DIC-treated glutes and gluten control at 1% (w/v) concentration in distilled water was examined at pH 3. Protein solutions were prepared as described in the determination of solubility properties. In total, 5 ml of the protein solution was homogenized with

5 ml of corn oil by ultraturax (IKA model T18D digital, USA) at 23,500 rpm for 90 s to form an emulsion. The emulsion formed was then centrifuged at 3630×g for 25 min.

EC was calculated by measuring the height of the emulsified layer in the centrifuge tube ( $H_1$ ) and the total height of the liquid ( $H_T$ ) and reported as:

$$EC (\%) = \frac{H_1}{H_T} \times 100$$

### 2.6.3 Determination of Foaming Ability

Foaming ability (FA) was evaluated by Caessens et al. [27] method. Firstly, 10 ml of gluten proteins solution at 1% (w/v)/pH 3, prepared as previously described, was placed in a beaker. After, the solution was homogenized with Ultraturax (IKA model T18D digital, USA) at 1000 rpm for 2 min. Foaming ability (FA) of samples was calculated by the following equation:

$$FA (\%) = \frac{V - V_0}{V_0} \times 100$$

$V_0$  is the total volume of the initial solution and  $V$  is the volume of the solution no foaming (ml).

### 2.6.4 Determination of IgA Antigliadin Antibodies Immunoreactivity

A non-competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure the immunoreactivity of IgA antibodies from celiac patients against gliadins from DIC-treated gluten samples. For gliadin extraction, 50 mg of gluten powder was dispersed in 4 ml of 70% ethanol, mixed for 1 h and centrifuged at 3000×g for 10 min at room temperature, and supernatant was freeze-dried. Briefly, microplates were coated with 5 µg/mL gliadins in coating buffer (0.1 mol l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) overnight. After washing (3 times) with phosphate-buffered saline Tween (PBST) (15 m mol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 mol l<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.4, containing 0.2% Tween 20), the plates were blocked with 1% BSA in PBST for 2 h at room temperature followed by 3 washes and incubated with a human serum samples (3 CD-diagnosed patients) diluted 1: 201 in PBST containing 0.1% gelatin (PBSTG).

After incubation for 30 min at room temperature, plates were washed 3 times and incubated with HRP-conjugated antihuman IgA antibodies in PBSTG (1: 2000 dilution). After three washes, activity was developed with chromogen/substrate in the dark. After 15 min, the reaction was stopped with 1 mol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance was measured at 450 nm (microplate reader, TECAN, Infinite F50, Switzerland). Percentage of immunoreactivity was

calculated as the ratio of the absorbance at 450 nm of gliadins from DIC-treated gluten with respect to gliadins from the control reaction. Immunoreactivity was duplicated for each sample [28].

### 2.7 Statistical Analysis

The functional properties and free thiol content data were studied through the analyses of variance (ANOVA) and multiple regressions using Minitab software (version 13.31, Minitab Inc., USA). Similarly, the secondary structure data and the immunoreactivity data of each patient were studied by analysis of variance (ANOVA) and Tukey’s test using GraphPad Prism software (version 7, Inc., USA). Statistical significance was accepted at a level of  $p < 0.05$ . The response surfaces were plotted with

**Table 1** Design of experiments of DIC treatment

Sample	Codes ( $X_1, X_2$ )	Temperature (°C) ( $X_1$ )	Time (s) ( $X_2$ )
$G_1$	(0, 0)	132.5	40
$G_2$	(+ $\alpha$ , 0)	165.0	40
$G_3$	(0, + $\alpha$ )	132.5	60
$G_4$	(0, 0)	132.5	40
$G_5$	(+1, +1)	155.5	54.1
$G_6$	(+1, -1)	155.5	25.9
$G_7$	(0, 0)	132.5	40
$G_8$	(-1, -1)	109.5	25.9
$G_9$	(-1, +1)	109.5	54.1
$G_{10}$	(0, 0)	132.5	40
$G_{11}$	(- $\alpha$ , 0)	100.0	40
$G_{12}$	(0, - $\alpha$ )	132.5	20
$G_{13}$	(0, 0)	132.5	40

**Table 2** Regression models for the response variables

	Functional properties			
	Solubility (%)	Emulsifying capacity (%)	Foaming ability (%)	Free thiol content ( $\mu\text{mol/g}$ of protein)
Temperature ( $X_1$ )	-4.33NS	-5.818*	-001145*	0.2030*
Time ( $X_2$ )	-7 NS	-1.134*	-0.0666*	-0.0106NS
Temperature/time ( $X_1X_2$ )	-28.19*	-0.333NS	-0.0375NS	-0.0412NS
Temperature <sup>2</sup> ( $X_1^2$ )	-15.93*	-1.417*	-0.1006*	-0.679*
Time <sup>2</sup> ( $X_2^2$ )	2.64NS	0.250NS	-0.0006 NS	-0.5596*
$R^2$ (%)	82.1	96	92.8	95.5
$p$ (Model)	0.015*	0.000*	0.001*	0.000*

NS not significant

\*Significant at  $p < 0.5$

STATISTICA software (version 7.0, StatSoft, Inc., USA) (Table 1).

## 3 Results and Discussion

### 3.1 Model Fitting

The results of multiple regression analysis of DIC wheat gluten properties are presented in Table 2 through the coefficients of the linear and quadratic effects of each of the factors and the interaction between them. The adequacy of the model is indicated through the model significance ( $p < 0.05$ ) and satisfactory of determination coefficient ( $R^2 > 70\%$ ) [29, 30]. The multiple regression analysis of solubility indicated that the model was significant ( $p = 0.015$ ) and it could be explained by 82.1% of the variance in data. The significant  $p$  values of emulsifying capacity, foaming ability and free thiol content were 0.000, 0.001 and 0.000, respectively. Their models got data variance  $R^2$  of 96%, 92.8% and 95.5%, respectively. The statistical results allowed the validation of the experimental results.

### 3.2 Impact of DIC on Chemical Properties

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was conducted to investigate the changes in the secondary structure of wheat gluten treated by DIC. The composition of all samples, untreated and DIC-treated gluten, is shown in Table 2. The gluten control contained 7.77%  $\beta$ -sheets, 12.11%  $\beta$ -turns, 23.88%  $\alpha$ -helixes, 30.17% random coil, 22.35% antiparallel  $\beta$ -sheets and 3.73% intermolecular  $\beta$ -sheets.

The results obtained in this study were different than those reported by Nawrocka et al. [31]. They observed that wheat gluten extracted from dough contained 11%  $\beta$ -sheets, 13%  $\beta$ -turns, 60%  $\alpha$ -helixes, 8% antiparallel  $\beta$ -sheets and 8%

aggregates. This discrepancy can be attributed to numerous factors such as washing out, freeze-drying and pulverizing [31]. This difference is probably also related to wheat varieties used to produce the flour.

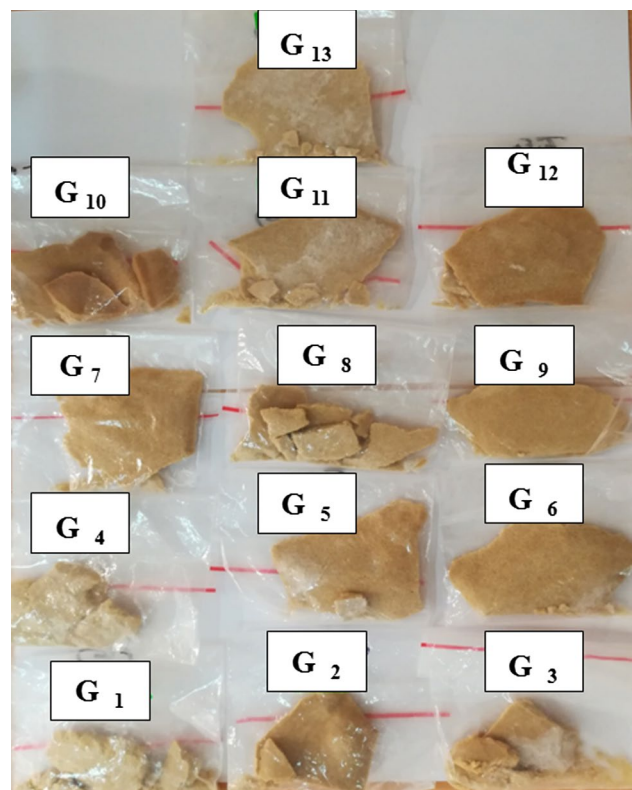
As shown in Table 2, we note major changes in the secondary structure of wheat gluten after DIC treatment. All components of the secondary structure were significantly different than those of wheat gluten control. Table 2 also shows that  $\beta$ -sheet structure of DIC-treated gluten ranging from 9.62 to 43.91% has increased in relation to the one of control (7.77%). Our result is in agreement with those of Georget and Belton [32] who found that hydration and heating implied changes when the  $\beta$ -sheet structure occurs. The low hydration due to the steam condensing on the surface of gluten and high temperature during DIC treatment causes this change.

Moreover, the  $\beta$ -turns structure included between 8.51 and 24.75% showed an increase except for  $\beta$ -turns for wheat gluten treated at 109.5 °C for 54 s. As reported in the literature [19], the increase in structures  $\beta$  resulted in a more hydrophobic and rigid structure which explains the rigidity and hardness of wheat gluten powder after DIC treatment as mentioned in Fig. 1.

According to Yong et al. [33], the  $\beta$ -turn structure is composed mainly of Glu and Asp and  $\beta$ -sheet is formed from Gln residues in gluten. Therefore,  $\beta$ -turns have increased due to the release of Glu and Asp. A significant loss was observed for  $\alpha$ -helixes structure, ranging from 6.16 to 16.43%. As for random coil, it decreased except for gluten samples treated at 132.5 °C for 40 s (31.20%) and 132.5 °C for 20 s (31.55%). Similarly, antiparallel  $\beta$ -sheets decreased compared to that for wheat gluten control (22.35%) except of that for DIC-treated gluten at 100 °C during 40 s (24.31%) (Table 3).

However, intermolecular  $\beta$ -sheet due to protein aggregation, including between 5.49 and 10.93%, was increased. These results showed clearly that DIC treatment involved the unfolding of gluten proteins. Guerrieri et al. [34] argued that the denaturation of wheat gluten can be detected above 80 °C. As reported by Mounir and Allaf [14], the protein denaturation is among the irreversible changes in microorganism cells treated by DIC.

Further information about chemical modifications induced by DIC treatment was obtained by free thiol content measurement. Figure 2d illustrates the effect of DIC treatment on free thiol content of gluten. The thiol content of gluten control was  $6.43 \pm 0.072$   $\mu\text{mol/g}$  of protein, whereas its concentrations after DIC treatment, ranging from 3 to 5  $\mu\text{mol/g}$  of protein, decreased. Figure 2d also indicates that both factors had a negative quadratic effect on thiol content of DIC-treated gluten. The concentration of free thiol was correlated with the increasing factors (temperature, time treatment) until limits were reached, where the response decreased beyond the central zone of the experimental



**Fig. 1** Aspect of wheat gluten powder after DIC treatment: rigidity of wheat gluten powder GC: gluten control, G1–G13: DIC-treated glutes

domain. It increased from 3  $\mu\text{mol/g}$  at 5  $\mu\text{mol/g}$  of protein in the treatment ranges of 100–132.5 °C of temperature and 20–40 s of time. However, it decreased from 5 to 3  $\mu\text{mol/g}$  of protein in the treatment intervals of 132.5–165 °C of temperature and 40–60 s of time.

Disulfide bonds of gluten proteins have a key role in their functionality in wheat flour. The  $\alpha$ - and  $\gamma$ -gliadins contain six cysteine and eight cysteine residues, respectively, leading to intra-chain disulfide bonds contrary to  $\omega$ -gliadins that lack cysteine, whereas the low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) contain both intra- and inter-chain disulfide bonds among themselves and with high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) forming glutenin polymers [35]. The quantity of free thiol content depended on numerous factors such as temperature, pH and hydrostatic pressure. These results showed that DIC treatment probably induces oxidation of free thiol; in other words, the formation of a new disulfide bridge indicates aggregate formation.

Guerrieri et al. [34] reported that changes in disulfide bridging are involved at temperatures above 100 °C. The rearrangements and the formation of these bonds can increase by unfolding the native structure under high pressure/high temperature causing denaturation and polymerization of wheat gluten proteins [36].





**Table 3** Secondary structure components of untreated gluten and DIC-treated gluten samples determined by FTIR spectroscopy

Band position (cm <sup>-1</sup> )	[1687, 1690]	[1665, 1670]	[1650, 1660]	[1640, 1645]	[1629, 1632]	[1612, 1614]
Secondary structure	β-Sheets (%)	β-Turns (%)	α-Helices (%)	Random coil (%)	Antiparallel β-sheets (%)	Intermolecular β-sheets due to protein aggregation (%)
Gluten control	7.77 ± 0.01 <sup>a</sup>	12.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	23.88 ± 0.03 <sup>h</sup>	30.17 ± 0.04 <sup>h</sup>	22.35 ± 0.02 <sup>i</sup>	3.73 ± 0.05 <sup>a</sup>
132.5 °C, 40 s	16.15 ± 0.12 <sup>e</sup>	13.27 ± 0.05 <sup>c</sup>	16.23 ± 0.06 <sup>f</sup>	31.20 ± 0.12 <sup>i</sup>	15.38 ± 0.05 <sup>h</sup>	7.77 ± 0.16 <sup>c</sup>
165 °C, 40 s	15.43 ± 0.16 <sup>d</sup>	15.59 ± 0.15 <sup>e</sup>	16.25 ± 0.15 <sup>f</sup>	25.43 ± 0.24 <sup>d</sup>	18.16 ± 0.15 <sup>g</sup>	9.13 ± 0.52 <sup>f</sup>
132.5, 60 s	9.62 ± 0.06 <sup>b</sup>	20.08 ± 0.03 <sup>i</sup>	16.43 ± 0.03 <sup>g</sup>	28.03 ± 0.05 <sup>g</sup>	17.36 ± 0.02 <sup>f</sup>	8.48 ± 0.06 <sup>e</sup>
155.5 °C, 54.1 s	43.19 ± 0.12 <sup>h</sup>	24.75 ± 0.14 <sup>j</sup>	12.01 ± 0.07 <sup>c</sup>	9.10 ± 0.05 <sup>a</sup>	5.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	5.49 ± 0.16 <sup>b</sup>
155.5 °C, 25.9 s	13.16 ± 0.21 <sup>c</sup>	17.22 ± 0.13 <sup>g</sup>	15.82 ± 0.12 <sup>e</sup>	27.16 ± 0.21 <sup>e</sup>	15.72 ± 0.12 <sup>d</sup>	10.93 ± 0.37 <sup>g</sup>
109.5 °C, 25.9 s	16.86 ± 0.12 <sup>f</sup>	18.22 ± 0.08 <sup>h</sup>	14.10 ± 0.06 <sup>c</sup>	27.63 ± 0.13 <sup>f</sup>	14.33 ± 0.05 <sup>c</sup>	8.85 ± 0.2 <sup>ef</sup>
109.5 °C, 54.1 s	43.91 ± 0.16 <sup>i</sup>	8.51 ± 0.06 <sup>a</sup>	6.16 ± 0.04 <sup>a</sup>	23.22 ± 0.16 <sup>c</sup>	8.93 ± 0.0 <sup>b</sup>	9.27 ± 0.16 <sup>f</sup>
100 °C, 40 s	17.80 ± 0.11 <sup>g</sup>	16.03 ± 0.07 <sup>f</sup>	12.18 ± 0.05 <sup>b</sup>	22.44 ± 0.09 <sup>b</sup>	24.31 ± 0.05 <sup>j</sup>	7.24 ± 0.15 <sup>d</sup>
132.5 °C, 20 s	16.62 ± 0.14 <sup>f</sup>	14.28 ± 0.06 <sup>d</sup>	14.88 ± 0.06 <sup>d</sup>	31.55 ± 0.13 <sup>j</sup>	16.78 ± 0.03 <sup>e</sup>	5.89 ± 0.13 <sup>b</sup>

Different letters (a–j) indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

DIC-treated gluten proteins and control gluten proteins were separated according to their molecular weights by SDS-PAGE under reducing conditions. The SDS-PAGE patterns are illustrated in Fig. 3a. The different fractions of gluten protein were determined by referring to molecular weight markers and literature data [37]. The protein profiles of thirteen DIC-treated gluten and untreated gluten did not show a significant difference.

Furthermore, we observe that the number and the intensity of the bands of all samples did not decrease or increase. The bands ranged between 70–90 kDa and 30–45 kDa corresponding to HMW-GS and LMW-GS, respectively, whereas the bands had 28–45 kDa corresponding to ω-gliadins, α-, β- and γ-gliadins. These results suggest that DIC treatment did not induce any modification of protein fractions gluten.

The same results were found when the glutes treated at different temperatures (132.5, 165 and 100 °C) and during the same period of time (40 s) were separated according to their isoelectric points and molecular weights as shown in Fig. 3b. There are no significant differences between untreated gluten and the different DIC-treated gluten patterns. These results indicate that the wheat gluten proteins had the same molecular weight and the same charge after DIC treatment. Our results are in good agreement with Boughallout et al. [18], which showed that the SDS-PAGE patterns of DIC-treated milk proteins, bovine caseins and whey protein, at 144 °C for 25 s, are identical with one of the untreated milk proteins.

However, this observation is contrary to the study of Guillamón et al. [15], which suggested that SDS-PAGE patterns of proteins extracted from lupin seeds treated by DIC at 132.5 °C (300 kPa) and 159 °C (600 kPa) for 1 and 3 min showed a disappearance of conglutin β and a decrease in bands intensity of conglutin α as treatment time was

increased. Therefore, the effect of DIC on proteins depends on treatment duration and food matrix.

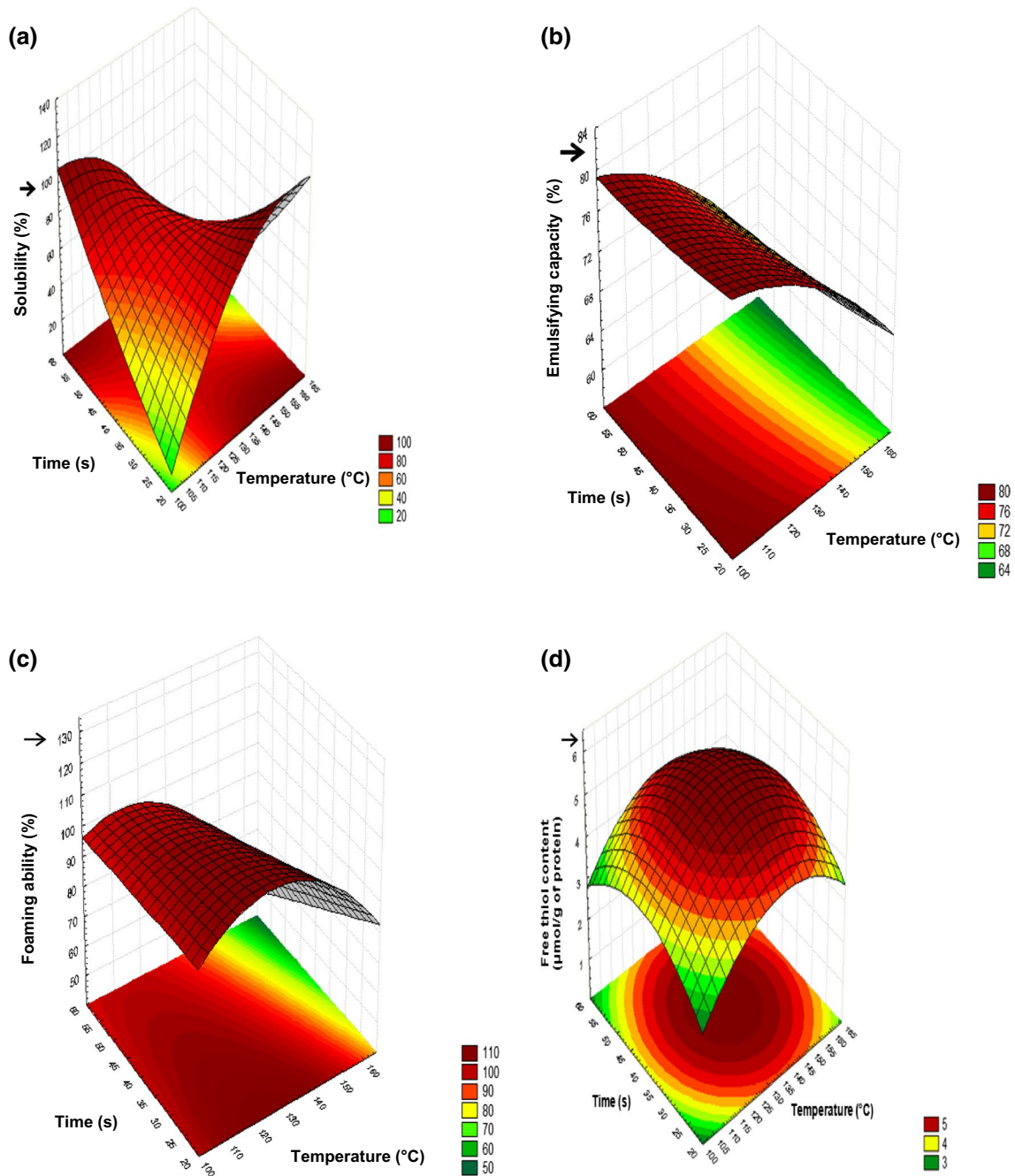
### 3.3 Impact of DIC on Wheat Gluten Functional Properties

Gluten may be used as a functional protein additive in various applications other than baking due to its desirable structure-enhancing properties [38]. Figure 2a presents the response of the surface of the effect of DIC treatment on gluten solubility. As shown in this figure, DIC treatment reduced significantly the solubility, changing from 20 to 100%. A negative quadratic effect of temperature and a negative interactive effect on gluten protein solubility were observed. The minimum values of solubility were obtained at 100 °C for 20 s and at 165 °C for 60 s, whereas the maximum values were observed at 100 °C for 60 s and 165 °C for 20 s.

In general, the emulsifying capacity (EC) is the first functional property determinate during the development and testing of new protein ingredients [39, 40]. Figure 2b illustrates the effect of DIC treatment on EC. The values of EC for DIC-treated gluten, varied from 65 to 80%, were lower than EC of untreated gluten 88.33 ± 5.55%. The response surface showed that both temperature and time treatment had a linear negative effect on EC. In addition, the temperature had a negative quadratic effect. The EC maximum values (80%) corresponded to the lowest temperature of 100 °C and the shortest time of 20 s and vice versa.

Concerning foaming ability (FA), the same effect of DIC treatment was observed. All the FA values of DIC-treated gluten were lower than the one of gluten control, which was 130 ± 31%, as shown in Fig. 2c. It is varied from 50 to 110%. Both temperature and time treatment had a negative linear effect on foaming ability. Negative quadratic effect of





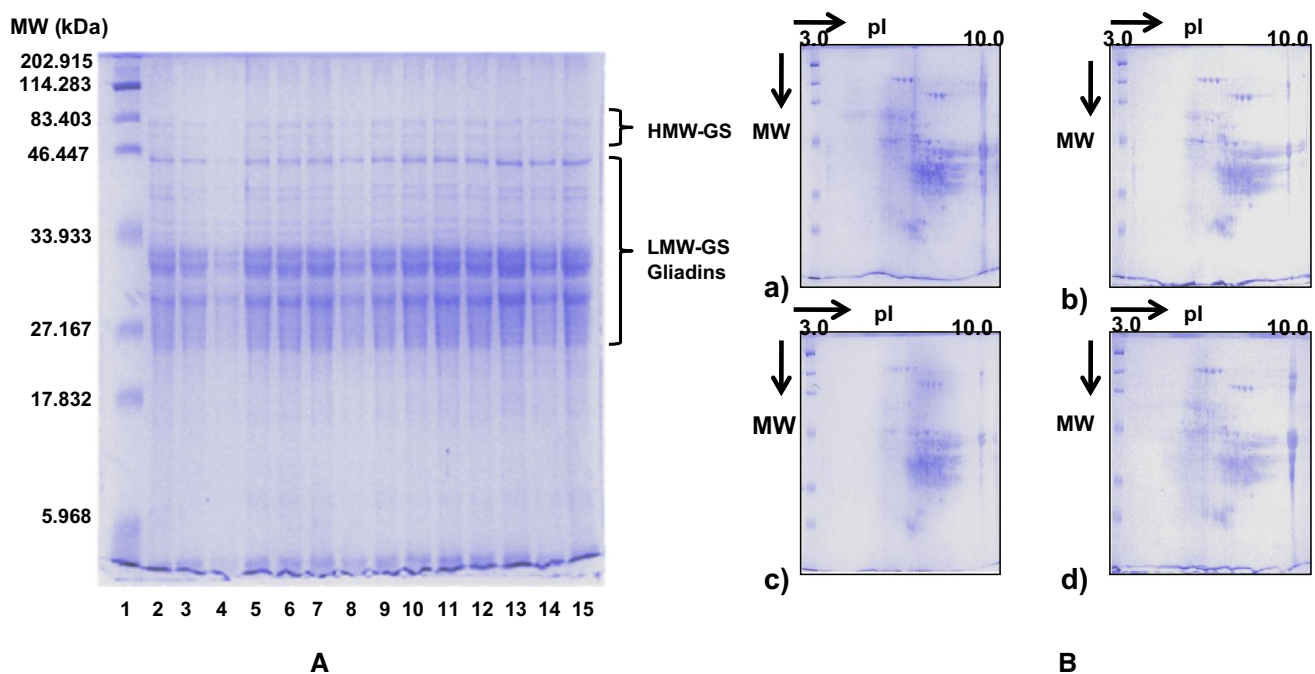
**Fig. 2** Response surfaces of impact of DIC treatment on protein solubility (a), emulsifying capacity (b), foaming ability (d) and free thiol content (d), →: untreated gluten value

temperature was also observed. The lowest foaming ability of DIC-treated wheat gluten was noted at the highest DIC treatment (165 °C for 60 s), whereas the maximum values were recorded in a large zone ([100, 150] °C for [20, 55] s).

The functional properties of proteins are affected by numerous factors such as source, pH, concentration, solubility and temperature. The protein solubility is tightly related to the content of hydrogen bonds and hydrophobic and

hydrophilic residues on the protein surface. It is the result of the active properties of proteins such as foaming, emulsification, fat and flavor-binding properties. This surface active depends principally on composition and distribution of amino acid, molecular flexibility and to a small degree on the shape and the size [26].

The solubility is affected by the degree of thermal and non-thermal processing such as the DIC procedure that



**Fig. 3** Electrophoresis patterns of wheat gluten untreated and treated by DIC. **A**/SDS-PAGE pattern of gluten in reducing conditions (1: molecular mass marker kDa. 2: lane untreated gluten proteins. 3–15: lanes DIC-treated gluten proteins G<sub>1</sub> to G<sub>13</sub>. HMW-GS: high molecular weight glutenin subunits, LMW-GS: low molecular

weight glutenin subunits. **B**/Two-dimensional electrophoresis pattern (IEF×SDS-PAGE) of untreated and DIC-treated gluten [**a**: untreated gluten, **b**: DIC-treated gluten G<sub>1</sub> (132.5 °C, 40 s), **c**: DIC-treated gluten G<sub>2</sub> (165 °C, 40 s), **d**: DIC-treated gluten G<sub>11</sub> (100 °C, 40 s)]

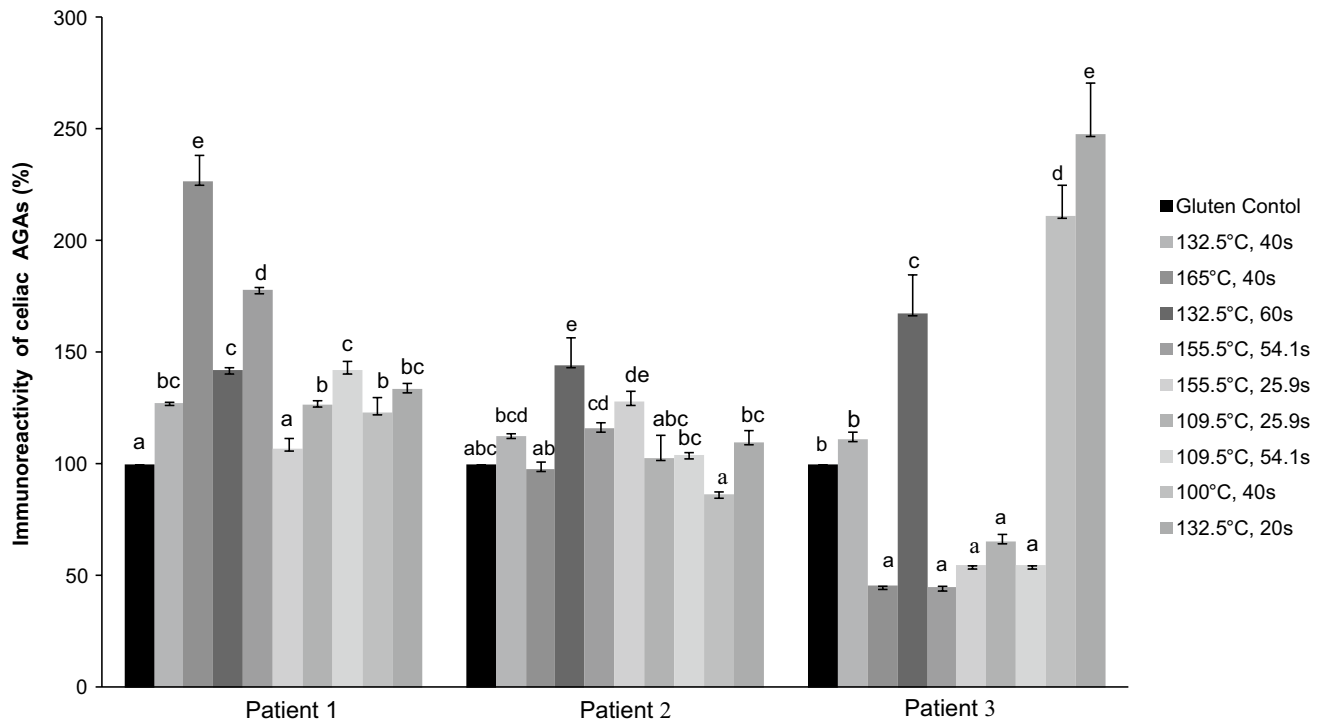
combines heat and steam pressure in a short time following by an instant pressure drop to vacuum. These processing methods lead to the formation of oligomers, changes in surface hydrophobicity and denaturation of proteins that responsible for solubility reduction [34].

Han et al. [41] reported that the functional properties are closely related to the secondary structure. The changes of protein structure can alter the functional properties including solubility, apparent viscosity, emulsifying, foaming, immunoreactivity and gelling properties. These results are in good agreement with the previous results of FTIR. The increase in hydrophobicity due to the increase in  $\beta$ -structures ( $\beta$ -turns,  $\beta$ -sheets and intermolecular  $\beta$ -sheets) was probably responsible for protein solubility reduction. Despite the short time of DIC treatment (20–60 s), the high temperature applied in this treatment involved the diminution of solubility. As observed by Morel et al. [42], heat treatment of wheat gluten induced solubility loss. The solubility is strongly correlated with other properties such as emulsification and foaming characteristics. The diminution of foaming ability and emulsifying capacity could be explained by the diminution of the solubility.

### 3.4 Impact of DIC on Celiac IgA Antigliadins Antibodies Immunoreactivity

Celiac IgA antibodies immunoreactivity against gliadin extracted from untreated and DIC-treated gluten samples was determined by indirect ELISAs using three celiac disease patients' sera. The effect of DIC on immunoreactivity is presented in Fig. 4. For patient 1, the immunoreactivity of DIC-treated gluten varied between  $107.22 \pm 4.69\%$  and  $226.54 \pm 12.29\%$  corresponded, respectively, to the immunoreactivity of gluten samples DIC treated at 155.5 °C for 25.9 s and 165 °C for 40 s. There is a significant difference between gluten control immunoreactivity (100%) and those of DIC-treated gluten sample ( $p < 0.0001$ ) except the gluten treated at (155.5 °C, 25.9 s) which did not indicate any difference. The IgA-binding ability of DIC-treated gluten significantly enhanced.

For patient 2, the immunoreactivity changed from  $86.24 \pm 1.58\%$  to  $144.37 \pm 12.55\%$  successively corresponding to immunoreactivity of gluten DIC treated at 100 °C for 40 s and 132.5 °C for 60 s. The results of ANOVA showed a significant difference between the immunoreactivity of all samples ( $p < 0.0001$ ). The



**Fig. 4** Immunoreactivity of celiac IgA antigliadin antibodies (AGAs) determined by indirect ELISA. Different letters (a–e) indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

multiple comparisons showed that only the immunoreactivity values of gluten samples DIC treated at 155.5 °C for 26 s and 132.5 °C for 60 s, were significantly different than the immunoreactivity of gluten control.

For patient 3, the immunoreactivity varied between  $44.79 \pm 1.04\%$  and  $247.91 \pm 22.91\%$  for gluten DIC treated at 155.5 °C for 54.1 s and 132.5 °C for 20 s, respectively. The ANOVA results showed that there is a significant difference between immunoreactivity samples ( $p < 0.0001$ ). Compared to gluten control immunoreactivity 100%, only the immunoreactivity of gluten treated at 132.5 °C for 60 s, 100 °C for 40 s and 132.5 °C for 20 s, significantly increased, whereas the immunoreactivity values of DIC gluten differently treated at 155.5 °C for 54.1 s, 165 °C for 40 s, 109.5 °C for 54.1 s, 155.5 °C for 25.9 s and 109.5 °C for 25.9 s, were lower than the one of untreated gluten.

These results demonstrated that the same DIC treatment had different effects on the binding of IgA from different patients to gliadins. These differences can be related to the age of patients and immunogenic epitopes [28, 43]. Immunodominant epitopes were recognized by nearly all CD patients; however, simply immunogenic epitopes were recognized by only some CD patients. Gluten toxicity in celiac disease is due to an immunoresponse that involves the innate and adaptive systems, and the immunoresponse varies considerably between patients with CD [44].

Globally, the DIC treatment increased the celiac IgA antigliadin antibodies' immunoreactivity.  $\alpha$ -Gliadin was indicated as the most immunogenic wheat proteins with regard to celiac disease following to some extent  $\gamma$ -gliadins and glutenins [45]. The conformational changes in food proteins induced by severe thermal processing are known to affect the immune recognition properties [46]. The structural changes of DIC-treated gluten detected by FTIR could lead to a higher exposure of immunogenic epitopes of gliadins, and their unmasking may explain the marked increase in gluten immunoreactivity.

Numerous toxic epitopes are found within areas characterized by conformations stabilized by disulfide bonds [47, 48]. Most of all, the increase in the  $\beta$ -turn structure resulted from rearrangement and included the 33-mer peptide (57–89 residues of  $\alpha$ -gliadin) could also explain this increase [37]. Color changes in DIC-treated gluten (Fig. 1) associated with non-enzymatic browning products, a reaction between proteins and gluten sugars, may also affect the allergenicity of proteins [49, 50].

## 4 Conclusion

This study aimed to determine the impact of DIC treatment on the structural, functional and immunological properties of wheat gluten. The results of this research indicated that

the DIC treatment gives a rigid aspect to wheat gluten due to the enhancement of  $\beta$ -structures.

In addition, the loss of secondary structure and formation of disulfide bonds led to the denaturation and the aggregation that reduced the solubility, emulsifying capacity and foaming ability. Although the DIC treatment of wheat gluten can be perfectly controlled to perform such structural and functional properties, it is important to identify its specific and effective way of reducing gluten immunoreactivity, which normally should depend on the patients, whereas the immunoreactivity values of differently DIC-treated gluten samples were lower than the immunoreactivity of the untreated gluten. Thus, depending on the patient, the DIC treatment of gluten would then be optimized to reach a specific immunoreactivity.

**Acknowledgements** The authors would like to thank Prof. Mariana Fernandes from the Department of Chemistry, Trás-os-Montes e Alto Douro University (UTAD), Vila Real, Portugal, for her help in FTIR analysis and Prof. Ana Maria Calderon de la Barca from Research Center for Food and Development, A.C., Department of Nutrition, Hermosillo, Mexico, for her advices.

**Funding** This work was supported by the INATAA under Grant [D00L01N250120180003].

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The authors report no conflicts of interest.

## References

- Riba, A.; Bouras, N.; Mokrane, S.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N.: Aspergillus section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2772–2777 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.005>
- Ribeiro, M.; Nunes, F.M.; Guedes, S.; Domingues, P.; Silva, A.M.; Carrillo, J.M.; Rodriguez-Quijano, M.; Branlard, G.; Igrejas, G.: Efficient chemo-enzymatic gluten detoxification: reducing toxic epitopes for celiac patients improving functional properties. *Sci. Rep.* **5**, 1–17 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep18041>
- Ortolan, F.; Steel, C.J.: Protein characteristics that affect the quality of vital wheat gluten to be used in baking: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 369–381 (2017). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12259>
- Anderson, R.P.; Wieser, H.: Medical applications of gluten composition knowledge. In: Wrigley, C.W., Bekes, F., Bushuk, W. (eds.) *Gliadin and Glutenin: The Unique Balance of Wheat Quality*, pp. 387–409. AACCC407 International, St Paul (2006)
- Di Sabatino, A.; Corazza, G.R.: Coeliac disease. *Lancet* **373**, 1480–1493 (2009). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60254-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60254-3)
- Farrell, R.J.; Kelly, C.P.: Celiac sprue. *New Eng. J. Med.* **346**, 180–188 (2002). <https://doi.org/10.1056/NEJMra010852>
- Stamnaes, J.; Sollid, L.M.: Celiac disease: autoimmunity in response to food antigen. *Semin Immunol* **27**, 343–352 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.11.001>
- Green, P.H.; Cellier, C.: Celiac disease. *New Eng. J. Med.* **357**, 1731–1743 (2007). <https://doi.org/10.1056/NEJMra071600>
- Ciacci, C.; Ciclitira, P.; Hadjivassiliou, M.; Kaukinen, K.; Ludvigsson, J.F.; McGough, N.; Swift, G.L.: The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United Eur. Gastroenterol. J.* **3**, 121–135 (2015). <https://doi.org/10.1177/2050640614559263>
- Ciacci, C.; Ciclitira, P.; Hadjivassiliou, M.; Kaukinen, K.; Ludvigsson, J.F.; McGough, N.; Swift, G.L.: The gluten-free diet and its current application in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *United Eur. Gastroenterol. J.* **3**, 121–135 (2015). <https://doi.org/10.1177/2050640614559263>
- Panozzo, A.; Manzocco, L.; Lippe, G.; Nicoli, M.C.: Effect of pulsed light on structure and immunoreactivity of gluten. *Food Chem.* **194**, 366–372 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.042>
- Lamacchia, C.; Landriscina, L.; D’Agnello, P.: Changes in wheat kernel proteins induced by microwave treatment. *Food Chem.* **197**, 634–640 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.016>
- Allaf, K.; Vidal, P.: Feasibility Study of a New Process of Drying/Swelling by Instantaneous Decompression Towards Vacuum. *Chemical Engineering Department University of Technology of Compiègne, Compiègne* (1989)
- Mounir, S.; Allaf, K.: DIC-assisted hot air drying of post-harvest paddy rice. In: Allaf, T., Allaf, K. (eds.) *Instant Controlled Pressure Drop (DIC) in Food Processing*, pp. 45–55. Springer, New York (2014)
- Guillamón, E.; Burbano, C.; Cuadrado, C.; Muzquiz, M.; Pedrosa, M.M.; Sánchez, M.; Cabanillas, B.; Crespo, J.F.; Rodriguez, J.; Haddad, J.; Allaf, K.: Effect of an instantaneous controlled pressure drop on in vitro allergenicity to lupins (*Lupinus albus var Multolupa*). *Int. Arch. Allergy Immunol.* **145**, 9–14 (2008). <https://doi.org/10.1159/000107461>
- Cuadrado, C.; Cabanillas, B.; Pedrosa, M.M.; Muzquiz, M.; Haddad, J.; Allaf, K.; Rodriguez, J.; Crespo, J.-F.; Burbano, C.: Effect of instant controlled pressure drop on IgE antibody reactivity to peanut, lentil, chickpea and soybean proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **156**, 397–404 (2011). <https://doi.org/10.1159/000324443>
- Takács, K.; Guillamon, E.; Pedrosa, M.M.; Cuadrado, C.; Burbano, C.; Muzquiz, M.; Haddad, J.; Allaf, K.; Maczó, A.; Polgár, M.; Gelencsér, E.: Study of the effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on IgE-reactive legume-protein patterns by electrophoresis and immunoblot. *Food Agric. Immunol.* **25**, 173–185 (2014). <https://doi.org/10.1080/09540105.2012.759539>
- Boughellout, H.; Choiset, Y.; Rabesona, H.; Chobert, J.M.; Haertle, T.; Mounir, S.; Allaf, K.; Zidoune, M.N.: Effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on milk protein’s immunoreactivity. *Food Agric. Immunol.* **26**, 71–81 (2015). <https://doi.org/10.1080/09540105.2013.864607>
- Wang, P.; Chen, H.; Mohanad, B.; Xu, L.; Ning, Y.; Xu, J.; Wu, F.; Yang, N.; Jin, Z.; Xu, X.: Effect of frozen storage on physico-chemistry of wheat gluten proteins: studies on gluten-, glutenin- and gliadin-rich fractions. *Food Hydrocoll.* **39**, 187–194 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.009>
- Haddad, J.; Allaf, K.: A study of the impact of instantaneous controlled pressure drop on the trypsin inhibitors of soybean. *J. Food Eng.* **79**, 353–357 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.066>
- Jansens, K.J.; Lagrain, B.; Rombouts, I.; Brijs, K.; Smet, M.; Delcourt, J.A.: Effect of temperature, time and wheat gluten moisture content on wheat gluten network formation during thermomolding. *J. Cereal Sci.* **54**, 434–441 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.08.008>
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970)
- Hajós, G.; Gelencser, E.; Pusztai, A.; Grant, G.; Sakhri, M.; Bardocz, S.; Rowett, T.; Aberdeen, A.B.: Biological effects and



- survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 165–170 (1995). <https://doi.org/10.1021/jf00049a030>
24. Casella, M.L.; Whitaker, J.R.: Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties. *J. Food Biochem.* **14**, 453–475 (1990). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1990.tb00806.x>
  25. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951)
  26. Yasumatsu, K.; Sawada, K.; Moritaka, S.; Misaki, M.; Toda, J.; Wada, T.; Ishii, K.: Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 719–727 (1972). <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860321>
  27. Caessens, P.W.; Visser, S.; Gruppen, H.; Voragen, A.G.:  $\beta$ -Lactoglobulin Hydrolysis. I. Peptide Composition and Functional Properties of Hydrolysates Obtained by the Action of Plasmin, Trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 Protease. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2973–2979 (1999). <https://doi.org/10.1021/jf981229p>
  28. Cabrera-Chávez, F.; Rouzaud-Sández, O.; Sotelo-Cruz, N.; De La Barca, A.M.C.: Transglutaminase treatment of wheat and maize prolamins of bread increases the serum IgA reactivity of celiac disease patients. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1387–1391 (2008). <https://doi.org/10.1021/jf0724163>
  29. Polak-Berecka, M.; Waško, A.; Kordowska-Wiater, M.; Targoński, Z.; Kubik-Komar, A.: Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Braz. J. Microbiol.* **42**, 1485–1494 (2011). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400035>
  30. Granato, D.; de Araújo Calado, V.M.: The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. In: *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology*, pp. 1–18. Wiley, Hoboken (2014).
  31. Nawrocka, A.; Miś, A.; Szymańska-Chargot, M.: Characteristics of relationships between structure of gluten proteins and dough rheology—influence of dietary fibers studied by FT-Raman spectroscopy. *Food Biophys.* **11**, 81–90 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9419-y>
  32. Georget, D.M.R.; Belton, P.S.: Effects of temperature and water content on the secondary structure of wheat gluten studied by FTIR spectroscopy. *Biomacromol* **7**, 269–475 (2006). <https://doi.org/10.1021/bm050667j>
  33. Yong, Y.H.; Yamaguchi, S.; Matsumura, Y.: Effects of enzymatic deamidation by protein–glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6034–6040 (2006). <https://doi.org/10.1021/jf060344u>
  34. Guerrieri, N.; Enrica Alberti, V.E.R.A.; Cerletti, P.: Use of spectroscopic and fluorescence techniques to assess. *Cereal Chem.* **73**, 368–374 (1996)
  35. Veraverbeke, W.S.; Delcour, J.A.: Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**, 179–208 (2002). <https://doi.org/10.1080/10408690290825510>
  36. Qu, C.; Wang, H.; Liu, S.; Wang, F.; Liu, C.: Effects of microwave heating of wheat on its functional properties and accelerated storage. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 3699–3706 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2834-y>
  37. Tatham, A.S.; Shewry, P.R.: The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -gliadins. *J. Cereal Sci.* **3**, 103–113 (1985). [https://doi.org/10.1016/s0733-5210\(85\)80021-7](https://doi.org/10.1016/s0733-5210(85)80021-7)
  38. Agyare, K.K.; Addo, K.; Xiong, Y.L.: Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocoll.* **23**, 72–81 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.012>
  39. Zayas, J.F.: *Solubility of Proteins, Functionality of Proteins in Food*, 1st edn, pp. 6–75. Berlin, Springer (1997)
  40. Hall, G.M.: *Methods of testing protein functionality*, 1st edn. London Science and Business Media, London (2006)
  41. Han, Z.; Cai, M.J.; Cheng, J.H.; Sun, D.W.: Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **75**, 1–9 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.017>
  42. Morel, M.H.; Redl, A.; Guilbert, S.: Mechanism of heat and shear mediated aggregation of wheat gluten protein upon mixing. *Biomacromol* **3**, 488–497 (2002). <https://doi.org/10.1021/bm015639p>
  43. Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Corazza, G.R.: The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* **140**, 408–416 (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x>
  44. Di Sabatino, A.; Corazza, G.R.: Coeliac disease. *Lancet* **373**, 1480–1493 (2009). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60254-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60254-3)
  45. Scherf, K.A.; Koehler, P.; Wieser, H.: Gluten and wheat sensitivities—an overview. *J. Cereal Sci.* **67**, 2–11 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.008>
  46. Leszczynska, J.; Lacka, A.; Szemraj, J.; Lukamowicz, J.; Zegota, H.: The effect of microwave treatment on the immunoreactivity of gliadin and wheat flour. *Eur. Food Res. Technol.* **217**, 387–391 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0765-5>
  47. Salentijn, E.M.; Mitea, D.C.; Goryunova, S.V.; van der Meer, I.M.; Padioleau, I.; Gilissen, L.J.; Koning, F.; Smulders, M.J.: Celiac disease T-cell epitopes from gamma-gliadins: immunoreactivity depends on the genome of origin, transcript frequency, and flanking protein variation. *BMC Genom.* **13**, 277 (2012). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-277>
  48. Henderson, K.N.; Tey-Din, J.A.; Reid, H.H.; Chen, Z.; Borg, N.A.; Beissbarth, T.; Tahtham, A.; Mannering, S.I.; Purcell, A.W.; Dudek, N.L.; van Heel, D.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Anderson, R.: A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity* **27**, 23–34 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.015>
  49. Gruber, P.; Vieths, S.; Wangorsch, A.; Nerkamp, J.; Hofmann, T.: Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4002–4007 (2004). <https://doi.org/10.1021/jf035458+>
  50. Taheri-Kafrani, A.; Gaudin, J.-C.; Rabesona, H.; Nioi, C.; Agarwal, D.; Drouet, M.; Chobert, J.-M.; Bordbar, A.-K.; Haertle, T.: Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4974–4982 (2009). <https://doi.org/10.1021/jf804038t>

# *Annexes*

### Annexe 1. Fiche technique du gluten commercial

Produit	Gluten de blé naturel sans additifs. Il augmente le volume des produits finis.
Applications	- Pain - Pain de Mie et Pain Burger, - Croissant, - Brioche,....etc.
Caractéristiques	- Augmente le taux de protéine des farines. - Améliore l'élasticité et la force de la pâte. - Augmente le volume des produits finis.
Composition	Gluten du blé. « Tous nos ingrédients sont Halal »
Dosage	De 500 à 3000 g pour 100 Kg de farine (De 0,5% à 3%)
Poids net	10 Kg.
Aspect physique	Poudre farineuse fluide, de couleur beige.
Conditionnement	Sac de 10 Kg.
Conservation	24 mois.



**Annexe 2.** Composition des gels de l'électrophorèse SDS-PAGE pour la séparation des protéines de gluten traitées par la DIC

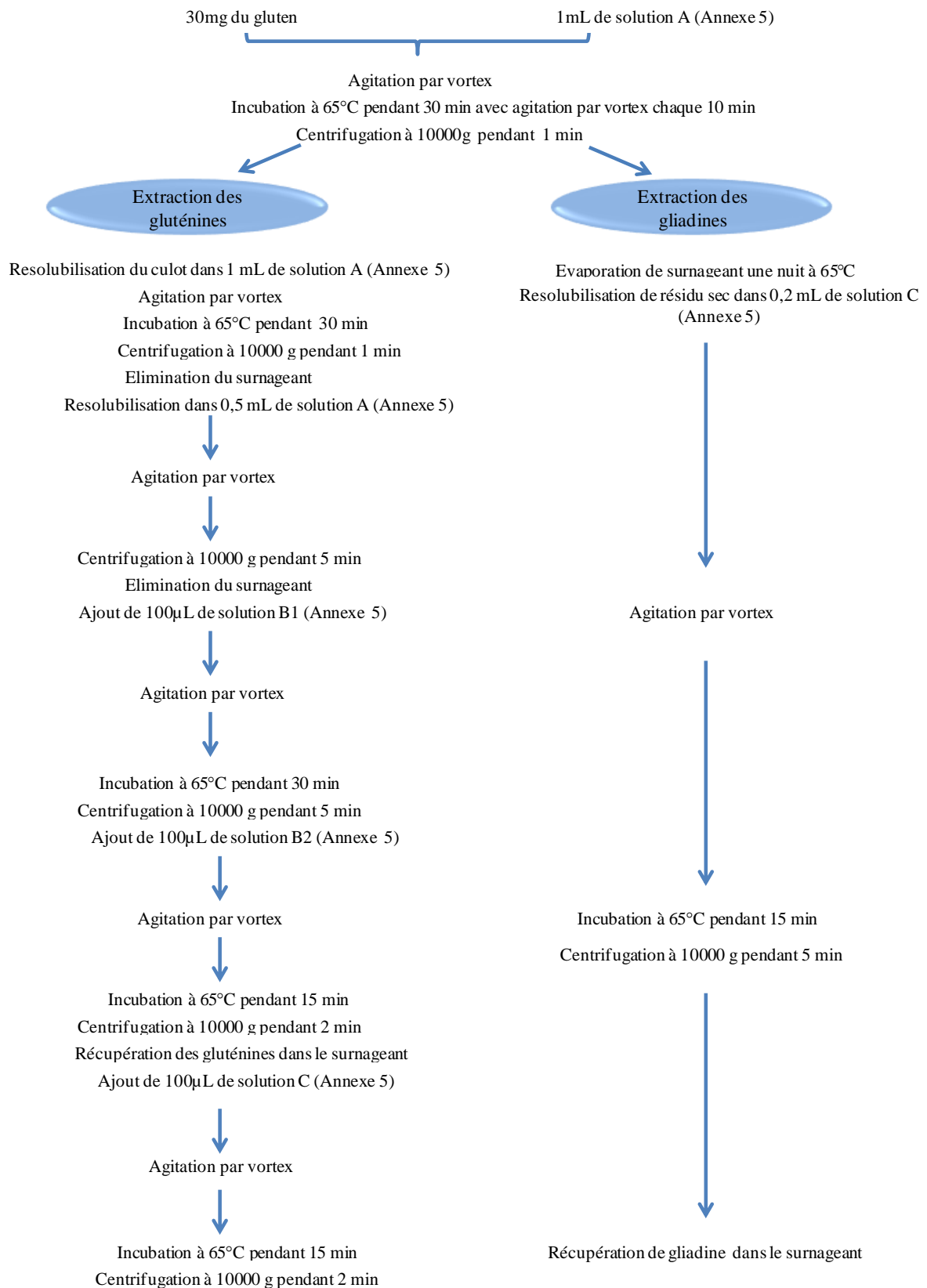
	<b>Gel de séparation 12%</b>	<b>Gel de concentration 6%</b>
Acrylamide-Bis 40% (38-2)	1,2 mL	0,2 mL
Tris-HCl 2M pH 8,8	0,665 mL	/
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	/	0,3 mL
Eau distillée	2,135 mL	2 mL
SDS 10%	40 µL	25 µL
APS 1%	40 µL	20 µL
TEMED	8 µL	4 µL

### Annexe 3. Caractéristiques de four à microondes domestique

Marque	Condor
Modèle	CMW-A3101
Alimentation électrique	230V, 50 Hz prise de terre monophasé
Puissance d'entrée	1400 W
Microondes GRILL	1050W
COMBI	2500W
Puissance de sortie	1000W
Fréquence	2450 MHz
Dimensions extérieures (L×H×P)	515 × 304 × 376 mm
Dimensions de la cavité	356 × 216 × 359 mm
Poids net approximatif	12,7 Kg
Minuterie	56 min 90s
Volume de la cavité	1.1 Cu.Ft

L : Longueur, H : Hauteur, P : Profondeur.

**Annexe 4.** Schéma de la préparation des protéines du gluten pour leurs séparations par SDS-PAGE (Protocole adopté par l'unité de Génomique et Protéomique fonctionnelles, UTAD, Vila Real, Portugal)



**Annexe 5.** Composition des solutions utilisées dans la préparation des protéines de gluten traitées par Micro-ondes pour leurs séparations par SDS PAGE

**Solution A**

1-Propanol	75 mL
Eau	Ajuster jusqu'à 150 mL

**Solution B**

1-Propanol	10 mL
Tris -HCl 1M pH 8	1,6 mL
Eau	Ajuster jusqu'à 20 mL

**Solution B1** : Solution B + 1% DTT

Solution B	7 mL
DTT	70 mg

**Solution B2** : Solution B+ 1,4% 4-Vinylpyridine (4-VP)

Solution B	7 mL
4-Vinylpyridine	98 $\mu$ L

**Solution B3** : Solution B+ 2,5% IAA

Solution B	7 mL
Iodoacétamide	175 mg

**Solution C**

SDS	20 mg
Glycérol	4 mL
Bleu de Bromophenol	2 mg

**Annexe 6.** Compositions des gels de l'électrophorèse SDS-PAGE pour la séparation des protéines du gluten traitées par Micro-ondes

**a.** Composition des gels de l'électrophorèse SDS-PAGE pour la séparation des gliadines

	<b>Gel de séparation 10,3%</b>	<b>Gel de concentration 3%</b>
Acrylamide 40%	12,54 ml	1,68 ml
Bis Acrylamide 2%	3,25 ml	0,49 ml
Eau bidistillée	13 ml	17,34 ml
Tris 0,5M pH 6,8	/	2,81 ml
Tris 2M pH 8,8	18,8 ml	/
SDS 10%	0,5 ml	0,2 ml
APS 1%	1,25 ml	1 ml
TEMED	25 µl	22,5 µl

**b.** Composition des gels de l'électrophorèse SDS-PAGE pour la séparation des gluténines

	<b>Gel de séparation 12,5%</b>	<b>Gel de concentration 3%</b>
Acrylamide 40%	15,31 mL	1,68 mL
Bis Acrylamide 2%	3 mL	0,49 mL
Eau bidistillée	10,5 mL	17,34 mL
Tris 0,5M pH 6,8	/	2,81 mL
Tris 2M pH 8,8	18,8 mL	/
SDS 10%	0,5 mL	0,2 mL
APS 1%	1,25 mL	1 mL
TEMED	25 µL	22,5 µL

## Résumé

La présente thèse avait pour but d'étudier les effets induits par la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) d'une part et les Micro-ondes (MO) d'autre part sur les propriétés fonctionnelles, structurales et immunologiques des protéines du gluten de blé afin de diversifier les aliments pour les personnes souffrants de la maladie cœliaque.

La méthodologie de surface de réponse a été appliquée pour étudier les effets linaires, quadratiques et d'interactions des facteurs impliqués. Dans la première partie, la poudre de gluten préparée à partir de la farine de blé tendre a été traitée par la DIC selon un plan composite central à deux facteurs, température comprise entre 100 et 165°C et temps compris entre 20 et 60 s. Les protéines du gluten traitées par la DIC ont été séparées par SDS-PAGE et l'électrophorèse bidimensionnelle. De plus, la teneur en groupements thiols libres, la solubilité, la capacité émulsifiante et moussante et l'immunoréactivité ont été mesurées. Dans la même partie, la poudre de gluten préparée et trois types de pains à base de blé ont été traités par un autre plan composite central plus intense, température comprise entre 100 et 165°C et temps compris entre 40 et 120 s. La réactivité R 5 après digestion peptique et trypsique de ces échantillons a été mesurée. Dans la deuxième partie, la poudre du gluten commercial a été traitée par microondes selon un plan composite central à deux facteurs, puissance comprise entre 200 et 1000 W et temps compris entre 20 et 60s. Après traitement, plusieurs paramètres ont été mesurés tels que la température maximale atteinte, la teneur en eau, la teneur en différentes protéines du gluten, la teneur en groupements thiols libres, l'abondance de la structure secondaire et les caractéristiques macromoléculaires de polymères, l'extractibilité des protéines de gluten, la résistance maximale à l'extension ( $R_{max}$ ), l'extensibilité totale (Ext) et la réactivité R5 après digestion peptique et trypsique. Une séparation électrophorétique a été également réalisée.

Après traitement DIC, le gluten de blé est devenu rigide, ce qui est dû à une augmentation significative des structures  $\beta$ . Une perte significative d'hélices  $\alpha$  et une augmentation significative des feuilletts  $\beta$  intermoléculaire et le réarrangement des liaisons disulfures signifient une dénaturation des protéines du gluten de blé. Cependant, la structure primaire n'a pas été affectée. Les propriétés rhéologiques ont été totalement perdues après traitement DIC. Le traitement DIC a également affecté les propriétés fonctionnelles. La solubilité des protéines, la capacité émulsifiante et la capacité moussante les plus faibles ont été obtenues dans les conditions de traitement DIC les plus élevées (165 ° C, 60 s). L'immunoréactivité des anticorps anti-gliadine IgA cœliaques du gluten de blé traité par la DIC a augmenté globalement. L'augmentation des épitopes toxiques du gluten et des pains traités par la DIC a montré l'incapacité de ce traitement à réduire leur immunoréactivité.

Concernant le traitement Micro-ondes, la teneur en eau a diminué et la température des glutens mesurée après traitement a augmenté. La teneur en gliadines extractibles a été affectée par ce traitement, à l'inverse de la teneur en gluténines extractibles. L'altération de la structure secondaire est liée à la désagrégation des polymères observée. Par ailleurs, le traitement Micro-ondes a augmenté la quantité d'épitopes potentiellement toxiques libérés après digestion, montrant ainsi l'inefficacité de ce traitement pour détoxifier le gluten pour les patients atteints de la maladie cœliaque.

**Mots clés :** protéines de gluten du blé, DIC, Micro-ondes, structure, immunoréactivité, propriétés fonctionnelles, méthodologie de surface de réponse, maladie cœliaque.

## Abstract

The aim of this thesis was to study the effects induced by Instant Controlled Pressure Drop (DIC) and microwaves on the functional, structural and immunological properties of wheat gluten proteins in order to diversify foods for people suffering from celiac disease.

The response surface methodology was applied to study the linear, quadratic and interaction effects of the factors involved. In the first part, the gluten powder prepared from the wheat flour was treated by the DIC according to central composite design with two factors, temperature between 100 and 165 ° C and time between 20 and 60 s. Gluten proteins DIC treated were separated by SDS-PAGE and two-dimensional electrophoresis. In addition, the content of free thiols, solubility, emulsifying and foaming capacity and immunoreactivity were measured. In the same part, the prepared gluten powder and three types of wheat-based breads were processed by another more intense central composite design, temperature between 100 and 165 ° C and time between 40 and 120 s. The reactivity R 5 after peptic and tryptic digestion of these samples was measured. In the second part, the commercial gluten powder was processed by microwave according to central composite design with two factors, power between 200 and 1000 W and time between 20 and 60 s. After treatment, several parameters were measured such as the maximum temperature reached after the microwave treatment, the water content, the content of various gluten proteins, the content of free thiols, the abundance of the secondary structure and the macromolecular characteristics of polymers, extractability of gluten proteins, maximum resistance to extension (R<sub>max</sub>), total extensibility (Ext) and R5 reactivity after peptic and tryptic digestion. Electrophoretic separation was also carried out.

After DIC treatment, wheat gluten became rigid, which is due to a significant increase in  $\beta$  structures. A significant loss of  $\alpha$ -helices and a significant increase in intermolecular  $\beta$ -sheets and the rearrangement of disulfide bonds signify the denaturation of wheat gluten proteins. The rheological properties were totally lost after DIC treatment. However, the primary structure was not affected. The DIC treatment affected functional properties. The lowest protein solubility, emulsifying capacity and foaming capacity were obtained under the highest DIC processing conditions (165 ° C, 60 s). The immunoreactivity of anti-gliadin IgA celiac antibodies in wheat gluten treated with DIC was increased overall. The increase in toxic epitopes of gluten and DIC-treated breads demonstrated the inability of this treatment to reduce their immunoreactivity.

Regarding the microwave treatment, the water content decreased and the temperature of the glutes measured after treatment increased. The content of extractable gliadins was affected by this treatment, while the content of extractable glutenins was not. The alteration of the secondary structure is related to the disaggregation of the polymers observed. In addition, microwave treatment increased the amount of potentially toxic epitopes released after digestion, showing the ineffectiveness of this treatment in detoxifying gluten for patients with celiac disease.

**Key words:** Wheat gluten proteins, DIC, Microwaves, structure, immunoreactivity, functional properties, response surface methodology, celiac disease.

## الملخص

كان الهدف من هذه الرسالة دراسة التأثيرات التي يسببها الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة (DIC) من ناحية والموجات الدقيقة (MO) من ناحية أخرى على الخصائص الوظيفية والهيكلية والمناعية لبروتينات جلوتين القمح. من أجل تنوع الأطعمة للأشخاص الذين يعانون من مرض الاضطرابات الهضمية.

تم تطبيق منهجية سطح الاستجابة لدراسة التأثيرات الخطية والتربيعية والتفاعلية للعوامل المعنية. في الجزء الأول ، تمت معالجة مسحوق الغلوتين المحضر من دقيق القمح الطري بواسطة الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة وفقًا لخطة مركزية مركبة ثنائية العوامل ، تتراوح درجة الحرارة بين 100 و 165 درجة مئوية والوقت بين 20 و 60 ثانية. تم فصل بروتينات الغلوتين المعالجة بالاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة بواسطة SDS-PAGE والرحلان الكهربائي ثنائي الأبعاد. بالإضافة إلى ذلك ، تم قياس محتوى الثيول الحر وقابلية الذوبان والاستحلاب والقدرة على الإرخاء والنشاط المناعي. في نفس الجزء ، تمت معالجة مسحوق الغلوتين المحضر وثلاثة أنواع من الخبز المصنوع من القمح وفقًا لخطة مركزية مركبة أخرى أكثر كثافة ، ودرجة الحرارة بين 100 و 165 درجة مئوية والوقت بين 40 و 120 ثانية. تم قياس تفاعل R 5 بعد الهضم الهضمي لهذه العينات. في الجزء الثاني ، تمت معالجة مسحوق الغلوتين التجاري بواسطة الميكروويف وفقًا لخطة مركبة مركزية ثنائية العوامل ، تتراوح الطاقة بين 200 و 1000 واط والوقت بين 20 و 60 ثانية. بعد المعالجة ، تم قياس العديد من المعلمات مثل درجة الحرارة القصوى التي تم الوصول إليها بعد المعالجة بالميكروويف ، ومحتوى الماء ، ومحتوى بروتينات الغلوتين المختلفة ، ومحتوى مجموعات الثيول الحرة ، ووفرة الهيكل الثانوي ، و الخصائص الجزيئية للبوليمرات ، قابلية استخراج بروتينات الغلوتين ، المقاومة القصوى للتمدد (Rmax) ، القابلية للتمدد الكلي (Ext) وتفاعل R5 بعد الهضم الهضمي تم إجراء الفصل الكهربائي أيضًا.

بعد معالجة الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة ، أصبح جلوتين القمح جامدًا ، ويرجع ذلك إلى زيادة كبيرة في الهياكل  $\beta$ . تشير الخسارة الكبيرة في حلزونات ألفا وزيادة كبيرة في الصفائح بين الجزيئات وإعادة ترتيب روابط ثاني كبريتيد إلى تمسخ بروتينات جلوتين القمح. فقدت الخصائص الانسيابية تمامًا بعد علاج الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة. ومع ذلك ، لم يتأثر الهيكل الأساسي. أثر علاج الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة على الخصائص الوظيفية. تم الحصول على أقل قابلية للذوبان في البروتين و قدرة الاستحلاب و قدرة الرغوة في ظل أعلى ظروف معالجة الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة (165 درجة مئوية ، 60 ثانية). تمت زيادة الفعالية المناعية للأجسام المضادة للجلوتين IgA المضاد للاضطرابات الهضمية لجلوتين القمح المعالج باستخدام الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة بشكل عام. أظهرت الزيادة في الحامات السامة للجلوتين والخبز المعالج بالاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة عدم قدرة هذا العلاج على تقليل نشاط المناعة.

فيما يتعلق بالمعالجة بالميكروويف، انخفض محتوى الماء وزادت درجة حرارة الجلوتينات المقاسة بعد المعالجة تأثر محتوى الجليادين القابل للاستخراج بهذه المعالجة ، بينما لم يتأثر محتوى الغلوتينين القابل للاستخراج. يرتبط تغيير الهيكل الثانوي بتفكيك البوليمرات التي لوحظت بالإضافة إلى ذلك، زاد العلاج بالميكروويف من كمية الحوام التي يحتمل أن تكون سامة والتي يتم إطلاقها بعد الهضم، مما يدل على عدم فعالية هذا العلاج في إزالة سموم الغلوتين لمرضى السيلياك.

**الكلمات المفتاحية:** جلوتين القمح، الاسترخاء الفوري الخاضع للرقابة ، الميكروويف، البنية، الاستجابة المناعي ، الخواص الوظيفية، منهجية الاستجابة السطحية ، مرض السيلياك.