

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

N° d'ordre : 85/D35/2022

N° de série : 02/B10/2022



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Science de la Nature et de la Vie
Spécialité : Biochimie / Nutrition

Présentée et soutenue par : DJEGHIM Hanane

Intitulé :

**Diversité génétique des variétés d'arachides (*Arachis hypogaea*) en Algérie.
Recherche et caractérisation de leurs allergènes**

Membre du jury :

Président : HAMIDECHI M.A Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1
Directeur de thèse : KHELIFI D. Prof. Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie
Co-directeur : BELLIL I. MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1
Examineur : SOBHI W. Prof. Université Ferhat Abbes Setif 1
Examineur : BECHKRI S. MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués dans le Laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologie Végétale (GBBV) de l'université Frères Mentouri Constantine 1 sous la direction du **Dr. BELLIL Ines** et dans les laboratoires du centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) sous la direction du **Dr. AZIOUNE Ammar**.

La réalisation d'une thèse est la somme d'un travail collectif où l'apport de chacun, bien que d'importance inégale, est toujours indispensable et précieux.

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr. KHELIFI Douadi**, directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie, Constantine, qui a bien voulu diriger ce travail, je voudrais lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accordé sa confiance, son temps et ses conseils, ainsi que d'avoir contribué à ma formation scientifique. Vous trouverez ici Mr l'expression de mon admiration et de ma reconnaissance.

Je voudrais exprimer mes remerciements au **Dr. BELLIL Ines**, Maitre de conférences A, à l'université Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté de me co-encadrer Je la remercie pour sa gentillesse, sa disponibilité, et sa patience. Pour tout cela et aussi pour son aide, sa confiance et son soutien moral, je la remercie vivement.

J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid**, Professeur à l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse et d'évaluer ce travail.

Je tiens aussi à remercier vivement **Dr. BECHKRI Sakina** Maitre de Conférence (A) à l'Université Frères Mentouri Constantine 1, **Pr. SOBHI Wided**, Professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1, qui m'ont fait un grand honneur en acceptant d'examiner cette thèse et de m'avoir accordé de leur temps si précieux pour apprécier et juger ce travail. Trouvez ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux et toute ma considération.

Un spécial remerciement pour, **Dr. AZIOUNE Ammar**, le Directeur du centre de recherche en biotechnologie (CRBt), pour ces encouragements et pour l'intérêt qu'il a accordé à mon projet de recherche je le remercie également de m'avoir offert l'occasion de réaliser une partie de cette thèse au niveau de son établissement. Je tiens à remercier aussi **Dr. Debbi Ali** et **Dr. Boudchicha Ryma** pour leur aide très précieuse.

Je remercie aussi mon "binôme non officiel" : **Dr. Mebrek Saâd**

Un grand merci à **Mme. Zroughen Fatima Zohra**, ingénieur au niveau de Institut Technique Des Grandes Cultures (ITCMI) pour son aide non conditionnée et ses conseils.

Merci pour tous ceux qui ont participé à la réussite de ce travail. J'espère bien que ce modeste travail pourrait servir aux générations qui viennent et rajouter une contribution et un plus dans le domaine de la recherche.

Hanène



Dédicace

Mes remerciements vont tout d'abord au bon dieu pour la volonté et la patience qu'il m'a donné durant ces longues années d'étude afin que je puisse arriver à ce stade

Du fond de mon cœur, je dédie ce présent travail :

*A celle qui est sacrifiée pour mon éducation, qui est ma source de tendresse de don et de confiance qui attendu ma réussite ma chère mère : **Fatima** qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance avec mes vœux de bonne santé et de longue vie*

*A mon cher père : **Ammar***

*A mes sœurs : **Amina, Nadia, Sabrina, et Naouel***

*A mes frères : **Chaouki, faycal, Billel***

*A mes neveux : **Iyed et Nail Chahine***

*A mes amies : **Naima, Dallel, Esma, Amina, Ibtissem, Djamila, Sabrina et Cheima** que notre amitié dure pour toujours*

*A mes collègues : **Ryma et Ali***

*Enfin je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail particulièrement **Mr. Mebrek Saâd***

Hanène

Publications et communications

Publications

I. Publications internationales

1. **Djeghim, H.**, Bellil, I., Temim, E., Boufendi, H & Khelifi, D. (2022). Identification of hypoallergenic peanut (*Arachis hypogaea*) accessions using Balb/c mice model. International immunopharmacologie.
2. **Djeghim, H.**, Bellil, I., Boudchicha, R. H., Boumegoura, A., & Khelifi, D. (2022). First Records on Genetic Diversity and Population Structure of Algerian Peanut (*Arachis hypogaea*) Using Microsatellite Markers. Plant Molecular Biology Reporter, 40(1), 136-147. <https://doi.org/10.1007/s11105-021-01305-7>.
3. **Djeghim, H.**, Bellil, I., & Khelifi, D. (2021). Genetic diversity of the Algerian peanut population analyzed using morphological markers and seed storage proteins. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции, 182(3), 111-124. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-9-22>.

Communications scientifiques

I. Communications internationales

1. **Djeghim, H.**, Bellil, I et Khelifi, D. (2019). Analyse de la diversité génétique par les marqueurs morphologique d'une population d'arachide (*Arachis hypogaea*) cultivée en Algérie. Genome and wheat sequencing.
2. **Djeghim, H.**, Bellil, I et Khelifi, D. (2019). Antihyperglycemic effects of four Algerian peanut landraces seed oil extracts. Congrès international de biotechnologie et valorisation des bio-ressources.
3. **Djeghim, H.**, Debbi, A, Bellil, I et Khelifi, D. (2018). Caractérisation morphologique et dosage des lipides de onze populations d'arachide cultivé en Algérie, Séminaire international sur les sciences alimentaires.

II. Communications nationales

1. **Djeghim, H.**, Bellil, I, Lekmine, S et Khelifi, D. (2021). Etude de l'activité anti diabétique de quatre variétés d'arachide Algérien. 1st National Semina on Biotechnology of Medicinal Plants and their Involvement in the Pharmaceutical and Food Industries.
2. **Djeghim, H.**, Bellil, I et Khelifi, D. (2019). Study of genetic diversity using proteomic analysis of Algerian peanut seed storage proteins. Séminaire Nationale sur les Biotechnologies en Algérie.

Table des matières		
Remerciements		i
Dédicace		ii
Publications et communications		iii
Liste des abréviations		iv
Liste des figures		v
Liste des tableaux		vi
Revue Bibliographique		
Introduction		1
1.	L'arachide (<i>Arachis hypogaea</i>)	4
1.1	Origine géographique et répartition mondiale de l'arachide	4
1.2	Situation de la culture d'arachide en Algérie	5
1.3	Description morphologique de d'Arachide	6
1.4	Origine génomique et phylogénie	7
2.	La diversité génétique	10
2.1	Les marqueurs génétiques	10
2.2	Importance des marqueurs moléculaires dans les études de la diversité génétique des plante cultivées	11
2.3	Méthodes d'étude de la diversité génétique	12
2.3.1	Les marqueurs morphologiques	12
2.3.2	Les marqueurs biochimiques	13
2.3.3	Les marqueurs moléculaires	14
➤	Cas des SSR	18
➤	Analyse de la diversité génétique à partir de données moléculaires	19
2.3.4	Synthèse des travaux antérieurs sur l'utilisation des marqueurs moléculaires dans les études de la diversité génétique de l'arachide cultivé	21
3.	L'allergie alimentaire	23
3.1	Définition de l'allergie alimentaire	23
3.2	Classification des allergies alimentaires	23
3.3	Physiopathologie et symptomatologie des allergies alimentaires	24
3.3.1	Symptômes cliniques de l'inflammation gastro-intestinale	27
3.3.2	Rôle des cytokines dans la réaction allergique	29
3.3.3	Fonction des cellules Th1 et Th2	29
3.4	L'allergie à l'arachide	30
3.4.1	Importance de l'allergie à l'arachide	30
3.4.2	Méthodes de diagnostic de l'allergie à l'arachide	31
3.4.2.1	Les tests <i>in vivo</i>	31
a.	Le test cutané	31
-	Le Prick test	32
-	Le patch test	32
-	Prick-prick test	32
b.	Le test provocation oral	32

c.	Le test de provocation labial	33
3.4.2.2	Les tests <i>in vitro</i>	33
a.	Test de libération de l'histamine	33
b.	Etude de la liaison IgE-allergène	33
-	Les immunoempreintes	34
-	Dosage des IgE sériques	34
3.4.3	Les allergènes de l'arachide	35
3.4.3.1	Définition et nomenclature	35
3.4.3.2	Classification et caractéristiques des allergènes de l'arachide	37
3.4.3.3	Identification des allergènes alimentaires	40
3.4.3.4	Utilisation des modèles animales dans les études des allergènes	41
3.4.3.5	Traitements d'actualité contre l'allergie à l'arachide	43
Partie expérimentale		
Matériel et méthodes		
1.	Présentation du matériel végétal et des sites de collecte	45
1.1	Présentation des sites de collecte	45
1.2	Présentation du matériel végétal	45
Partie I : Analyse de la diversité génétique		
1.	Caractérisation morphologique des plantes d'arachide	47
1.1	Descripteurs quantitatifs (agronomiques)	48
1.1.1	Mesure du contenu en chlorophylle	48
1.1.2	Mesure de la teneur en matière grasse	48
1.2	Descripteurs qualitatifs (morphologiques)	49
2.	Caractérisation Biochimique	55
2.1	Extraction des protéines de réserve	55
2.2	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	55
3.	Caractérisation moléculaire	56
3.1	Extraction de l'ADN	56
3.2	Vérification de la qualité et de la quantité des ADN extraits	56
3.3	Choix des marqueurs SSR	56
3.4	Réaction d'amplification en chaine (PCR)	57
3.4.1	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)	57
3.4.2	Electrophorèse capillaire sur séquenceur ABI 35000XL genetic analyzer	58
4.	Analyses des données morphologiques, biochimiques et moléculaires	58
4.1	Données morphologiques	58
4.1.1	Analyse des données quantitatives	58
4.1.2	Analyse des données qualitatives	59
4.2	Analyse des données biochimiques	59
4.3	Analyse des données moléculaires	59
4.3.1	Etude de la diversité génétique	60
4.3.2	Distance génétique entre les accessions et arbre phylogénétique	61

4.3.3	Structuration de la diversité génétique	61
Partie II : Recherche et caractérisation des allergènes de l'arachide		
1.	Création de modèle de souris allergiques aux arachides	63
1.1	Choix de l'animal	63
1.1.1	Souche de l'animal	63
1.1.2	L'âge de l'animal	63
1.1.3	Sexe de l'animal	63
1.2	Choix des variétés	63
1.3	Extraction des protéines totales	64
1.3.1	Dosage des protéines par la méthode de Bradford	64
1.4	Choix de l'adjuvant	65
1.5	Choix de la voie d'induction	65
2.	Induction de l'allergie aux protéines de l'arachide chez les souris Balb/c	66
2.1	Dosage des anticorps par la technique ELISA	67
2.2	Analyse statistique des données	68
2.3	Signes cliniques : test de provocation	68
2.4	Etude histologique	68
2.4.1	La fixation	69
2.4.2	Déshydratation et clarification	69
2.4.3	Inclusion à la paraffine	70
2.4.4	Traitement des lames ou microtomie	70
2.4.5	Déparaffinage et réhydratation	70
2.4.6	Coloration	71
2.4.7	Montage des préparations et observation microscopique	71
Résultats et discussion		
Chapitre I : Diversité génétique des accessions d'arachide algérien (<i>Arachis hypogaea</i>) analysée par les marqueurs morphologiques et les protéines de réserve		72
Chapitre II : Etude de la diversité génétique et structuration d'une population d'arachide algérien (<i>Arachis hypogaea</i>) par microsatellite		87
Chapitre III : Identification d'accessions hypoallergéniques d'arachide (<i>Arachis hypogaea</i>) en utilisant un modèle de souris Balb/c		100
Discussion générale		115
1.	Etude de la diversité génétique en utilisant les marqueurs morphologiques	115
2.	Etude de la diversité génétique en utilisant les marqueurs biochimiques	120
3.	Etude de la diversité génétique en utilisant les marqueurs moléculaires	123
4.	Etude du pouvoir allergénique des accessions d'arachide	127
Conclusion et perspectives		133
Références Bibliographiques		
Annexes		
Résumé		
Abstract		
ملخص		

Liste des abréviations

ACP	Analyse des Composants Principale
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Alum	Hydroxyde d'aluminium
AMOVA	Analysis of MOlecular VAriance
ANOVA	ANalysis Of VAriance
APS	Ammonium PerSulfate
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Class Differentiation
CAH	Classification Ascendante Hiérarchique
CS	Constante de Similarité
DC	Dendritic Cell
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
Ho	Hétérozygotie Observée
He	Hétérozygotie Attendue
IFN	Interféron
IgE	ImmunoGlobuline de type E
IgG	ImmunoGlobuline de type G
IL	INterleukine
i.p	Intra Péritonéale
N	Nombre de locus
NK	Natural Killer
OPD	Ortho Phényl Diamine
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Polymorphism Information Content
QTL	Quantitative Trait Loci
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RAST	Radio Allergo-Sorbent Test
Rf	Rapport frontal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPAD	Soil and Plant Analyze Developments
SSR	Single Sequence Repeat
TBE	Tris Borate EDTA
TCA	Tri Choroacetic Acid
TCR	T Cell Receptor
TEMED	N,N,N',N'-TEtraMEthyléthylèneDiamine
Th	T helper
Up	Ultra pure
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

Liste des figures

Revue Bibliographique		
Figure 1	Principaux pays producteurs d'arachides au monde	5
Figure 2	Production/Rendement de l'arachide non décortiqué en Algérie durant la période 2009-2019	5
Figure 3	Différentes parties de la plante de l'arachide	6
Figure 4	Idiogramme des espèces à génome A du genre <i>Arachis</i> . Distribution des ARN 5S (en rayé) et 18-25S (en noir) sur les chromosomes	8
Figure 5	Idiogramme de la nouvelle classification des espèces à génome B du genre <i>Arachis</i> . Distribution des ARN 5S (en rayé) et 18-25S (en noir) sur les chromosomes	8
Figure 6	Différents types de marqueurs	11
Figure 7	Exemples des méthodes de révélation des amplicons de microsatellites amplifier pour différentes espèces (a) en utilisant des amorces fluorescentes, (b) sur gel d'agarose, (c) sur gel de polyacrylamide	18
Figure 8	Indice de fixation (F) de Wright (1965) pour évaluer la structure génétique des populations	20
Figure 9	Classification des allergies alimentaires et les troubles associés	24
Figure 10	Voies de tolérance et de sensibilisation	25
Figure 11	Structure de l'immunoglobuline E, (b) Récepteur FcεRI des IgE, (c) Fixation des IgE sur leur récepteurs de haute affinité FcεRI	26
Figure 12	Mécanismes des réactions allergiques. (a) Phase de sensibilisation à l'allergène et développement de cellules B spécifiques et de cellules T mémoires. (b) Réaction d'hypersensibilité de type I	27
Figure 13	Organisation spatiale schématique du tissu lymphoïde associé à l'intestin	28
Figure 14	Classifications des atrophies villositaires. A - Marsh classification. B - Marche and Matuchansky's classification. C - N Brousse classification	28
Figure 15	Diagramme schématique du test d'immunoempreinte	34
Figure 16	Principe de la technique ELISA de type indirect	35
Figure 17	Structure tridimensionnelle des allergènes majeurs de l'arachide (A) Ara h1, (B) Ara h2, (C) Ara h3, (D) Ara h6	38
Figure 18	Configuration expérimentale, facteurs contribuant à la réussite de l'établissement et paramètres de lecture généralement étudiés dans les modèles publiés d'allergie alimentaire chez la souris	42
Matériel et méthodes		
Figure 1	Carte des lieux d'échantillonnage des accessions d'arachide étudiées	45
Figure 2	Culture des accessions d'arachide dans la serre	46
Figure 3	Schéma du calendrier des immunisations	66
Figure 4	Dissection de souris (a) aorte abdominal (b) prélèvement du jéjunum	67

Liste des tableaux

Revue Bibliographique		
Tableau 1	Sous espèces et variétés de <i>Arachis hypogaea</i>	9
Tableau 2	Comparaison entre les caractéristiques des marqueurs moléculaires les plus utilisés	14
Tableau 3	Avantages et inconvénients des différents marqueurs génétiques	17
Tableau 4	Liste de quelques programmes analytiques pour mesurer la diversité moléculaire (génétique) pour les marqueurs SSR	21
Tableau 5	Prévalence de l'allergie alimentaire	31
Tableau 6	Protéines allergènes de l'arachide (<i>Arachis hypogaea</i>)	36
Matériel et méthodes		
Tableau 1	Accessions d'arachide collecté et leurs origines	46
Tableau 2	Liste des caractères qualitatifs, des modalités et des codes utilisés	50
Tableau 3	Liste des SSRs utilisé	57
Tableau 4	Nom et origine des variétés utilisé pour l'étude <i>In vivo</i>	64

Introduction

Introduction générale

L'arachide est l'une des cultures légumineuses et oléagineuses les plus importantes dans le monde. En plus de son importance pour la sécurité alimentaire et nutritionnelle, l'arachide constitue une source de revenus pour des millions d'agriculteurs asiatiques et de l'Afrique subsaharienne (Varshney et al., 2017). En 2018, 45,9 millions de tonnes d'arachide ont été produites sur une surface de 28,5 millions d'hectares à travers le monde (FAOSTAT 2020). Par ailleurs, le genre *Arachis* joue un rôle crucial dans le développement agricole durable, en particulier là où la sécheresse et la salinité limitent fréquemment la production agricole au Maghreb et dans les régions subsahariennes (Giuffrè et al., 2016).

Malgré que l'arachide soit une culture importante sur le plan économique et nutritionnel, la diversité génétique de cette dernière est menacée par plusieurs facteurs tels que le remplacement des variétés locales par des cultivars à haut rendement, les calamités naturelles, la conversion des terres et des cultures et l'introduction de cultures exotiques (Mallikarjuna and Varshney, 2014). Une diversité génétique étroite et une carence en marqueurs d'ADN polymorphes dans les bases de données ont entravé la cartographie génétique et l'application de la sélection moléculaire de l'arachide cultivée en utilisant des marqueurs traditionnels tels que RAPD et RFLP (Hong et al., 2010).

Par ailleurs, les microsatellites présentent des niveaux de polymorphisme plus élevés que les autres marqueurs génétiques. Le contenu informatif élevé en raison du bon polymorphisme, de la co-dominance et de l'analyse rapide par PCR rend les microsatellites bien placés pour être exploités dans des applications de sélection végétale telles que l'analyse des relations variétales, la sélection de traits agronomiques, l'évaluation des germoplasmes et l'identification des variétés (Rafalski et al., 1996).

En Algérie les arachides constituent l'une de ces ressources naturelles qui sont de plus en plus en cours de disparition, l'importation massive et continue de cette ressource a eu pour conséquence la dégradation voire l'oubli des variétés locales. La remise en valeur de ces dernières nécessite une analyse du polymorphisme pour la description de la diversité génétique faisant appel à des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires. Cependant, malgré la qualité agronomique des variétés locales et la grande diversité géoclimatique du pays, aucune étude n'a été effectuée pour investiguer la diversité génétique et structurer les relations phylogénétiques entre les variétés d'arachide cultivées en Algérie.

Toutefois, les arachides représentent également la deuxième cause d'allergie alimentaire au monde à côté du lait et des œufs. Cette allergie se manifeste par des symptômes allant d'une simple diarrhée jusqu'au choc anaphylactique qui peut causer la mort. Le développement des sciences biologiques en particulier la génétique, la biologie moléculaire et l'immunologie a permis d'utiliser des techniques plus avancées pour identifier et caractériser les protéines responsables de cette allergie et d'étudier par conséquent plusieurs facteurs essentiels à savoir le mécanisme de réaction immunitaire de notre corps contre ces allergènes, les cartes épitopiques des différentes familles d'allergènes ainsi que les gènes responsables de l'expression de ces derniers.

Plusieurs études ont montré que la diversité des allergènes de l'arachide peut être influencée par sa diversité génétique, ses conditions de culture et son appartenance aux différentes espèces et sous espèces. La séquence peptidique et la conformation 3D des protéines de réserve des arachides dont la plupart sont des allergènes subit plusieurs mutations par nécessité évolutive et adaptative avec leur milieu de culture, d'où la présence de plusieurs isoformes d'allergènes (Guo et al., 2008 ; Hilu et al., 2019). La révélation d'une grande diversité génétique des variétés locales peut témoigner la présence d'une ou plusieurs variétés hypoallergéniques et/ou révéler la présence de nouveaux allergènes (Hilu et al., 2019).

C'est dans un cadre de contribution à la valorisation de notre patrimoine végétal que nous avons jugé nécessaire d'effectuer cette étude. Ce travail divisé en deux grandes parties a été entrepris avec les objectifs suivants :

- Pour la première partie de la thèse, il est question d'étudier la variabilité génétique d'une collection d'accessions d'arachide locales en utilisant des marqueurs agromorphologiques, protéiques et génétiques (SSRs) dans le but d'identifier les caractères morphologiques et protéiques les plus discriminants et les moins influencés par les conditions environnementales qui décrivent la variabilité phénotypique d'une part et d'analyser la structure et la relation phylogénique entre les accessions en utilisant les marqueurs génétiques d'autre part.
- Concernant la deuxième partie de la thèse et en se basant sur les résultats de la diversité génétique, il est question d'effectuer une évaluation de l'allergénicité des accessions d'arachide les plus éloignées génétiquement en utilisant un modèle animal de souris Blab/c, caractériser les protéines allergènes de l'arachide d'une part et sélectionner les accessions hypoallergéniques d'autre part dans le but d'améliorer la santé du citoyen.

Pour ce faire, le présent document détaille les différentes étapes suivies et les résultats obtenus. Il est divisé en trois grandes parties :

- ✓ La première est une synthèse bibliographique qui décrit l'espèce étudiée, son origine et ses caractéristiques d'une part et donne un aperçu sur l'allergie aux arachides, les symptômes de cette maladie, les méthodes de diagnostic et l'identification des différents allergènes de l'autre.
- ✓ La deuxième partie est dédiée à présenter le matériel utilisé et la méthodologie suivie pour l'étude de la diversité génétique, la création du modèle de souris Balb/c allergique ainsi que pour l'identification du potentiel allergénique des accessions d'arachides étudiées.
- ✓ La troisième partie présente les résultats obtenus sous forme d'articles avec une discussion générale.
- ✓ Enfin, l'étude est achevée par une conclusion générale qui résume les différents résultats obtenus et les perspectives de ce travail.

Revue Bibliographique

1. L'arachide (*Arachis hypogaea*)

1.1. Origine géographique et répartition mondiale de l'arachide

L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) est l'une des plus importantes oléagineuses cultivées dans le monde, notamment dans les régions arides et semi-arides de l'Afrique. Son succès réside dans le fait que c'est une oléo-protéagineuse aux nombreuses utilisations alimentaires et fourragères (graine, huile, tourteaux, fanes et coques). Sa graine à la fois riche en huile (50%) et en protéine (25%) fait l'objet d'emplois très diversifiés selon les pays producteurs (Amri-Tiliouine & Ounane, 2018). L'arachide est également une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Fabacées, elle montre une caractéristique unique de mûrir leurs fruits sous terre à partir d'une tige érigée ou rampante (Wright, 2004). Carl Linneaus avait décrit pour la première fois l'espèce d'arachide cultivée en 1753 comme *A. hypogaea* dérivé du mot «arachos» qui signifie une mauvaise herbe et «hypogaea» qui signifie une chambre souterraine (Stalker & Simpson, 1995; Barkley et al., 2016). L'arachide est originaire du sud de la Bolivie et du nord-ouest de l'Argentine, cultivé largement dans le Mexique, l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud à l'époque précolombienne (Van Der Vossen, 2007). Krapovickas avait rapporté que le centre de diversité du genre *Arachis* se localise dans le Mato Grosso au Brésil, où se trouve la plupart des sections qui dérivent de ce genre (Krapovickas, 1968). De même Gregory et ses collaborateurs (Gregory et al., 1980) ont qualifié la ville de Corumbá en Brésil, comme le centre de la zone d'où provient la répartition actuelle des *Arachis*.

Des types à deux graines originaires du Brésil ont été introduits en Afrique de l'Ouest, et des types à trois graines originaires du Pérou se sont diffusés de la côte ouest de l'Amérique du Sud vers les Philippines, d'où ils ont gagné le Japon, la Chine, l'Indonésie, la Malaisie, l'Inde, Madagascar et l'Afrique de l'Est (Van Der Vossen, 2007). De nos jours, l'arachide est cultivée dans la plupart des pays tropicaux, subtropicaux et tempérés situés entre 40°N et 40°S. Produite dans toute l'Afrique tropicale (Kan et al., 2006), c'est une très importante culture de rente au Sénégal, en Gambie, au Nigeria et au Soudan (Van Der Vossen, 2007). En 2019, plus de 48 millions de tonnes d'arachides ont été produites à travers le monde. La Chine est le plus grand producteur d'arachides au monde avec 17 572 798 tonnes de production par an. L'Inde arrive en deuxième position avec 6 727 180 tonnes de production annuelle (Fig.1) (FAOSTAT, 2021).

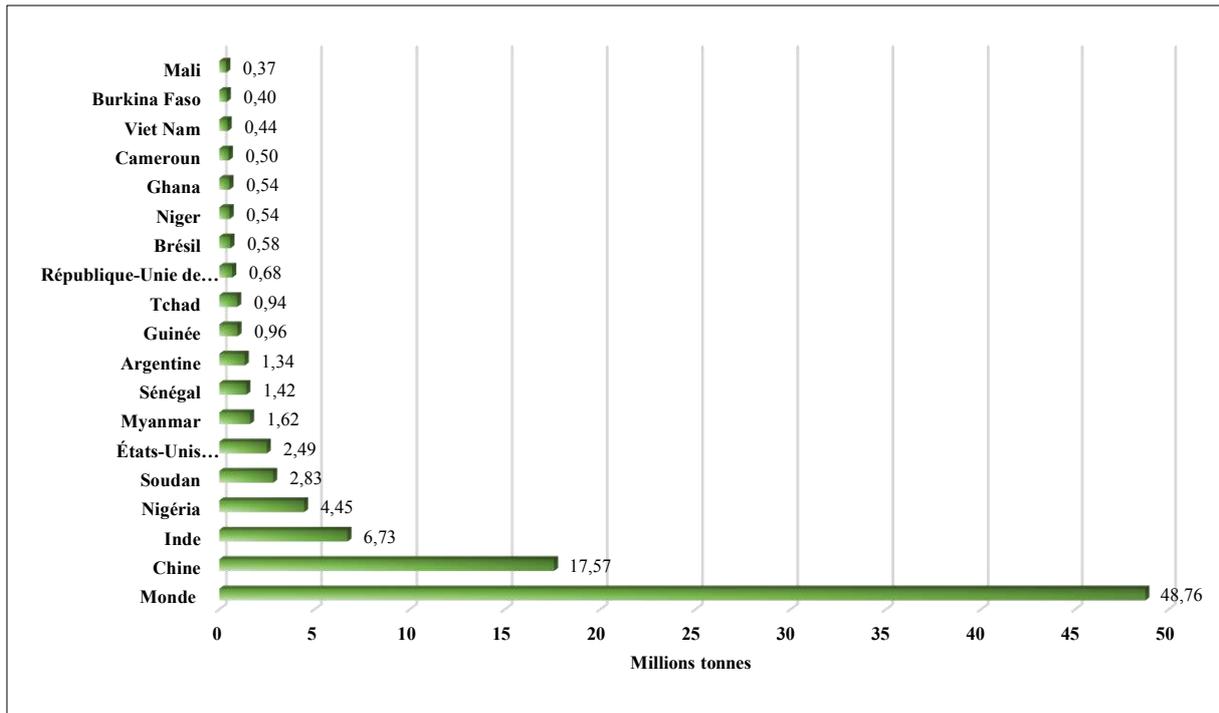


Figure 1. Principaux pays producteurs d'arachides au monde (FAOSTAT, 2021).

1.2. Situation de la culture d'arachide en Algérie

La culture d'arachide en Algérie n'a pas connu d'évolution significative depuis 2005 jusqu'au 2015 tant sur le plan des superficies cultivées que des productions (Fig.2). A partir de l'année 2016 la culture de l'arachide avait pris de l'ampleur en Algérie, les agriculteurs ont commencé petit à petit à consacrer plus de surfaces pour la production de ces graines (FAOSTAT, 2021).

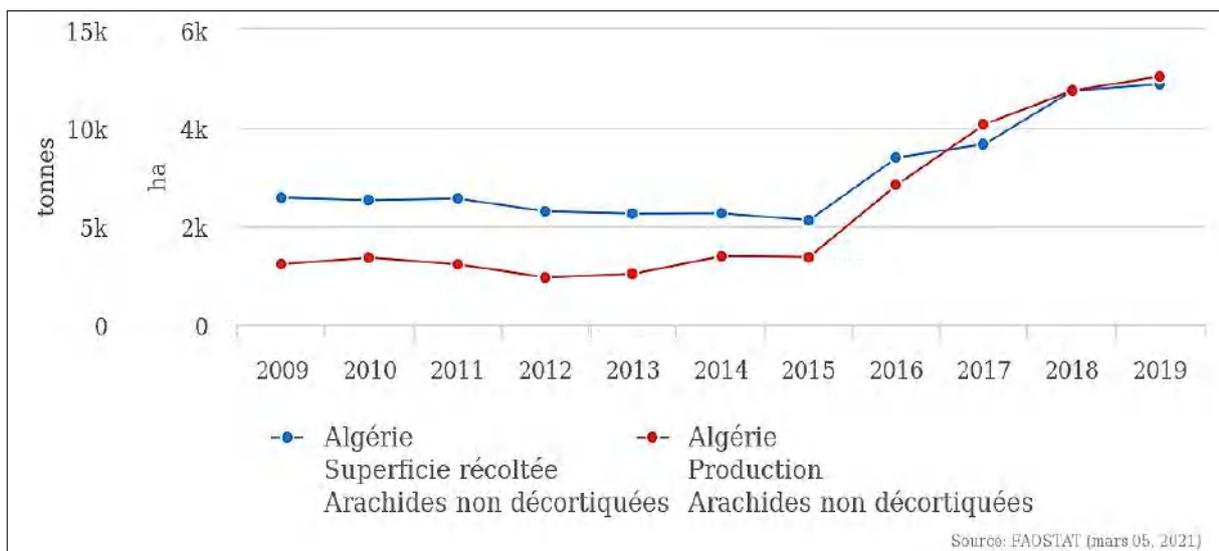


Figure 2. Production/Rendement de l'arachide non décortiqué en Algérie durant la période 2009-2019 (FAOSTAT, 2021).

L'arachide est cultivée actuellement dans plusieurs wilayas en Algérie à savoir El Tarf, Adrar, Ghardaïa, El Oued, Skikda, Bechar et El Bayedh où la nature des sols et le régime thermique répondent le mieux aux exigences de cette plante. L'espèce *Arachis hypogaea* L a été longtemps cultivée en Algérie comme arachide de bouche dans la région d'El Kala (d'où la variété « Arachide de la Calle », variété introduite d'Italie en 1926), et dans les Oasis sahariennes. Des variétés dites « à huile » originaire du Sénégal ont été expérimentées dans le Sud et l'Est du pays pour la production de l'huile (Amri-Tiliouine & Ounane, 2018).

1.3. Description morphologique de d'Arachide

Arachis hypogaea L est une espèce annuelle qui appartient à la famille des légumineuses (Fabaceae), elle mesure environ 30 à 50 cm de hauteur. Les feuilles sont alternes et pennées avec quatre folioles (deux paires opposées; pas de foliole terminale); chaque foliole mesure 1–7 cm de long et 1–3 cm de large (Variath & Janila, 2017) (Fig.3). Les fleurs de l'arachide sont portées en grappes axillaires au-dessus du sol (Suchoszek-Lukaniuk et al., 2011), elles apparaissent pour la première fois après 25 à 35 jours de la plantation, en fonction de la maturité de la variété et de l'environnement thermique dans lequel la culture est cultivée, et continuent à être produites jusqu'à la maturité finale. Les fleurs de l'arachide s'autofécondent, généralement les taux de croisement naturel sont faibles et ont été estimés entre 0,7% et 2,5% (Wright, 2004).



Figure 3. Différentes parties de la plante de l'arachide (*Oxford University Plants 400: Arachis hypogaea*, 2021).

Après 57 jours, la base de l'ovaire fécondé (gynophore ou cheville) commence à s'allonger vers le sol, pénétrant dans le sol jusqu'à une profondeur de 45 cm. L'ovaire commence alors à gonfler et se détourne horizontalement de la plante, ce qui prend entre 15 et 20 jours à compter de la floraison initiale (Wright, 2004). Les gousses, contenant généralement entre une à trois graines, se développent uniquement sous terre et chaque graine est recouverte d'un mince tégument. Les taux de croissance des gousses varient en fonction de la température, de l'état de l'eau, de la maturité variétale et de la capacité de partage (Variath & Janila, 2017). L'arachide a une racine pivotante bien développée, avec de nombreuses racines latérales qui s'étendent sur plusieurs pouces dans le sol. La plupart des racines ont des nodules. La plante préfère les limons sableux légers et bien drainés, mais poussera dans des sols plus lourds (Suchoszek-Lukaniuk et al., 2011).

1.4. Origine génomique et phylogénie

L'arachide appartient à la tribu des *Aeschynomeneae*, la sous-tribu des *Stylosanthenae* et au genre *Arachis*. Le genre *Arachis* comprend 80 espèces décrites qui ont été réparties en 9 sections en fonction de leur morphologie, de leurs caractéristiques chromosomiques et de leur compacité de croisement (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005). Les sections *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Trierectodes* et *Triseminatae* sont composées uniquement d'espèces diploïdes ($2n=2x=20$) (Stalker and Simpson, 1995). Les sections *Arachis* et *Rhizomatosae* sont composées d'espèces diploïdes ($2n=2x=20$, $2n=2x=18$) et d'espèces tétraploïdes ($2n=4x=40$) (Smartt & Stalker, 1982).

La section *Arachis* comprend 27 espèces sauvages diploïdes et deux espèces tétraploïdes annuelles qui sont *A. monticola* ($2n=4x=40$), la seule espèce tétraploïde sauvage de la section, et l'espèce cultivée *A. hypogaea* ($2n=4x=40$). Les espèces de la section *Arachis* ont été réparties en trois différents génomes sur la base de leur caryotype (Husted, 1936 ; Fernández & Krapovickas, 1994). Les espèces de génome A se caractérisent par la présence d'une paire de chromosomes plus petits (Fig.4). Cette caractéristique est absente chez les espèces de génome B qui se distinguent par ailleurs par une paire de chromosomes présentant une constriction secondaire. *A. glandulifera* se caractérise par un caryotype unique, asymétrique. C'est la seule espèce décrite de génome D (Stalker, 1991). Récemment, des études de cartographie des ARN 5S et 18-25S par l'analyse des caryotypes des espèces tétraploïdes *A. monticola* et *A. hypogaea* a révélé 20 chromosomes à caryotype similaire à celui du génome A et 20 autres chromosomes à caryotype similaire à celui du génome B (Fig.5) (Husted, 1936 ; Kochert et al., 1996 ; Seijo et al., 2007).

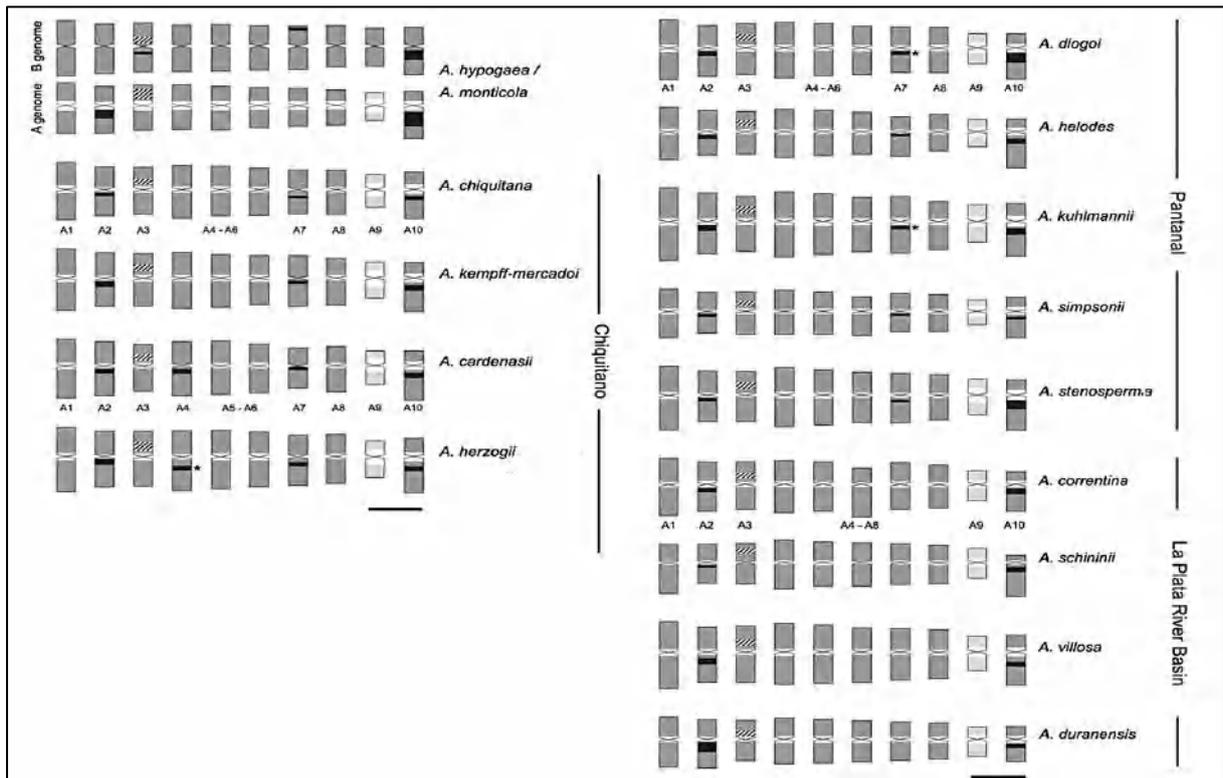


Figure 4. Idiogramme des espèces à génome A du genre *Arachis*. Distribution des ARN 5S (en rayé) et 18-25S (en noir) sur les chromosomes (Robledo et al., 2009).

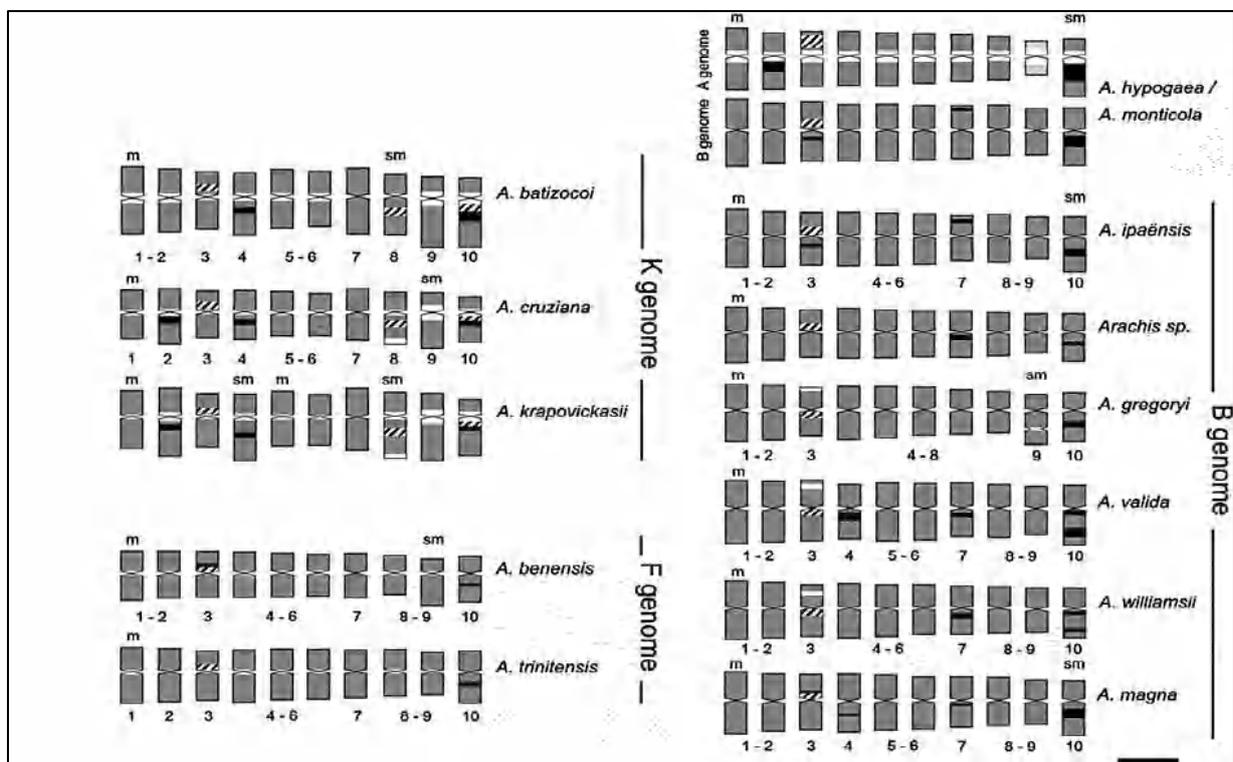


Figure 5. Idiogramme de la nouvelle classification des espèces à génome B du genre *Arachis*. Distribution des ARN 5S (en rayé) et 18-25S (en noir) sur les chromosomes (Robledo & Seijo, 2010).

Arachis hypogaea est une espèce hybride interspécifique dite amphidiploïde ou allotetraploïde provenant de la combinaison sauvage de deux espèces différentes *A. duranensis* et *A. ipaensis* (Kochert et al., 1991, 1996 ; Seijo et al., 2007). Des expériences de croisement entre *A. duranensis* et *A. ipaensis* ont montré que l'hybride diploïde est hautement stérile (Mallikarjuna et al., 2011). Les chercheurs ont alors conclu que si l'hybride avait été fertile, il n'aurait pas été nécessaire de doubler son nombre de chromosomes pour former l'amphidiploïde fertile. Il serait probablement resté diploïde plutôt que tétraploïde tel qu'il est aujourd'hui (Sanford, 1983). Il existe une forte diversité agro-morphologique au sein de l'espèce cultivée. Cette forte diversité a permis de distinguer deux sous-espèces dans le compartiment cultivé : *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* et *A. hypogaea* subsp. *fastigiata*. Ces sous-espèces se distinguent principalement par leur port, en général rampant chez *hypogaea* et érigé chez *fastigiata*, par l'absence de fleurs sur l'axe principal chez *hypogaea* et par la différence de coloration des feuilles qui sont de couleur vert-foncé chez *hypogaea* et vert-clair chez *fastigiata* (Krapovickas & Gregory, 1994). Ces deux sous-espèces ont été elles-mêmes subdivisées en plusieurs variétés botaniques qui comprennent plusieurs types commerciaux (Tab.1).

Tableau 1. Sous espèces et variétés de *Arachis hypogaea* (Stalker & Simpson 1995).

Variété	Type commercial	Caractéristiques
Sous espèce <i>hypogaea</i>		
<i>hypogaea</i>	/	* Pas d'axes floraux sur la tige principale ; * Alternance de paires de fleurs et des axes de reproduction sur les branches ; * Branches courtes ; * Tige Moins poilues.
	Virginia	* Tige Moins poilues et grosses graines.
	Runner	* Tige Moins poilues et petites graines.
<i>hirsuta</i>	Peruvian runner	* Tige plus poilues.
Sous espèce <i>fastigiata</i>		
<i>fastigiata</i>	Valencia	* Axes floraux sur la tige principale ; * Alternance de paires de fleurs et d'axes végétatifs sur les branches.
<i>peruviana</i>	/	* Tige moins poilues ; * Réticulation profonde des gousses.
<i>aequatoriana</i>	/	* Tige très poilue * Réticulation profonde des gousses. * Tiges dressé, pigmenté et plus ramifié.
<i>vulgaris</i>	Spanish	* Tige plus ramifié avec des branches droites.

2. La diversité génétique

La diversité génétique ou la variation génétique se réfère à la variation des gènes au sein des espèces, c'est-à-dire la variation héritable dans et entre les populations d'organismes (Xu, 2010 ; Jiang, 2013). La diversité génétique est générée par l'apparition et la disparition des variants génétiques appelés allèles (Ellegren & Galtier, 2016). Elle est à l'origine, avec l'environnement, de la variation des caractères observables, tels que la forme, la taille ou la couleur des individus d'une espèce (variation phénotypique). La diversité génétique dans les populations est la résultante des processus évolutifs (migration, dérive, sélection et mutation) qui exercent des pressions variables dans le temps et dans l'espace tendant soit à la diminuer (dérive et sélection), soit à l'augmenter (migration et mutation ; Ellegren & Galtier, 2016).

Même si la diversité génétique a longtemps été négligée dans les stratégies de conservation (Laikre, 2010 ; Hoffmann et al., 2015), une prise de conscience récente amène à la considérer (Taberlet et al., 2012 ; Carvalho et al., 2017). Et dans le but de mieux gérer nos ressources génétiques, il est nécessaire de maîtriser la diversité génétique en se basant sur la compréhension de sa structure et de son évolution.

2.1. Les marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est généralement considéré comme un facteur de variabilité génétique entre les individus d'une variété ou la population d'une espèce (Fig.6) (Brown, 1983). Il se traduit par plusieurs différences génétiques entre les individus et peut représenter des différences dans la séquence d'ADN, dans les caractéristiques biochimiques (par exemple dans la structure des protéines ou les propriétés isoenzymes), dans les propriétés physiologiques (par exemple la résistance au stress abiotique ou le taux de croissance) ou dans les caractères morphologiques tels que la couleur de la fleur ou la forme de la plante (Rao & Hodgkin, 2002).

Selon l'application et l'espèce impliquée, un marqueur moléculaire idéal doit être :

- *Polymorphe* : variable entre individus.
- *A hérédité simple*.
- *Multiallélique*.
- *Codominant* : en mesure de détecter les différentes formes du marqueur, en distinguant homozygotes et hétérozygotes.
- *Non épistasique* : son génotype peut être « lu » à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres loci.

La codominance et la non-épistasie peuvent être respectivement définies comme l'absence d'interactions intra et inter-locus.

- Réparti uniformément le long du génome.
- Discriminant : c'est à dire capable de détecter des différences entre individus proches apparentés.
- Non sujet aux influences.
- Neutre : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc éventuellement sélectifs) que ceux qui permettent de déterminer son génotype. Dans leur très grande majorité, les polymorphismes moléculaires sont neutres. Ceci est généralement une supposition, car généralement aucune donnée n'est disponible pour confirmer ou infirmer cette propriété.
- Reproductible.
- Economique : facile, rapide et peu coûteux pour sa détection sur un grand nombre d'individus. Si possible, l'équipement doit être à usage multiple dans l'expérience (Mazliak, 1999 ; Xu, 2010).

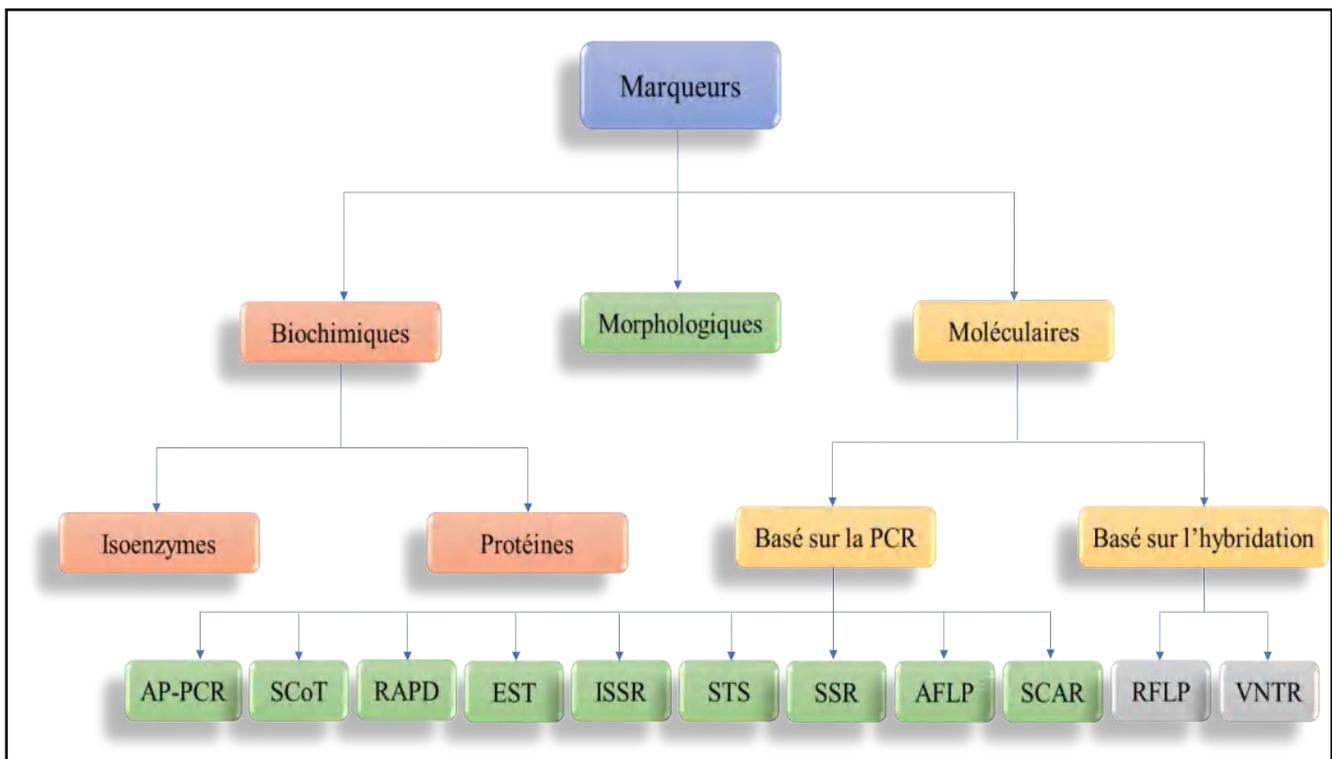


Figure 6. Différents types de marqueurs génétiques (Wani & Kumar, 2020).

2.2. Importance des marqueurs moléculaires dans les études de la diversité génétique des plantes cultivées

Les marqueurs moléculaires peuvent être utiles à différents stades de l'amélioration de toutes les cultures. Ils peuvent être utilisés pour étudier en profondeur la ségrégation et la liaison de

gènes ainsi que l'origine de la transmission des caractères (Roldán-ruiz et al., 2005). Ils peuvent être utilisés dans les programmes d'amélioration pour augmenter la probabilité de sélectionner les individus, d'une population, d'une descendance ou d'un croisement, qui possèdent la meilleure combinaison des propriétés désirées. Aussi, quand des marqueurs liés aux caractères ont été identifiés, il est possible de localiser les gènes responsables sur une carte génétique et de saturer la région génomique d'intérêt avec des marqueurs afin de cartographier finement les gènes responsables de l'expression du caractère. En fin, la localisation précise de gènes permet l'étude de la relation entre allèles pour des gènes particuliers (Rao & Hodgkin, 2002). Le choix des marqueurs dépend de l'objectif précis fixé et des moyens des utilisateurs. Les domaines d'application des marqueurs génétiques font apparaître des objectifs variés pour lesquels des marqueurs sont préconisés (Roldán-ruiz et al., 2005).

2.3. Méthodes d'étude de la diversité génétique

La conservation et l'utilisation efficaces des ressources phytogénétiques requièrent une évaluation précise (mesure et caractérisation) de la variation génétique qu'elles comportent au niveau inter ou intra spécifique. L'évaluation ayant pour objectif de décrire la diversité génétique en se basant sur la compréhension de sa structure et de son évolution fait souvent appel à des marqueurs morphologiques, biochimiques (protéines de réserve et isozymes), chromosomique ou moléculaires (marqueurs à ADN). En effet, le développement récent des biotechnologies offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour développer les stratégies de sélection et d'amélioration variétale.

2.3.1. Les marqueurs morphologiques

Traditionnellement, la diversité génétique est évaluée en mesurant la variation de traits phénotypiques qui se concentre sur les caractères morphologiques (la couleur et la forme de la graine, la couleur de la fleur, etc.) Ces caractéristiques définissent la forme et l'apparence d'un ensemble d'individus. Par ailleurs, les caractères agronomiques ont également un intérêt majeur. Ils sont généralement quantitatifs, contrôlés par plusieurs gènes et à manipulation complexe. Les caractères agronomiques sont souvent soumis aux besoins et choix commerciaux et peuvent être regroupés en plusieurs catégories : caractères liés à la production (précocité, rendement), la vigueur de plante, la qualité de fruit, la résistance aux stress biotiques (maladies et parasites) et abiotiques (stress hydrique, thermique, salinité). Malheureusement le nombre de marqueurs morphologiques est très limité, ils sont généralement dominants, rendant impossible la distinction entre individus homozygotes et hétérozygotes (Lefebvre & Chèvre, 1995 ; Kumar, 1999). Les informations obtenues au niveau phénotypique sont souvent difficiles à interpréter

car il s'agit de variations continues où de nombreux gènes peuvent y être impliqués. Certains de ces caractères peuvent être considérés comme “génétiques” si leur présence chez des individus apparentés est héritable et ne dépend pas de l’environnement, indiquant qu’ils sont associés à une séquence particulière d’ADN (Karp et al., 1997a, b ; Spooner et al., 2005).

2.3.2. Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques peuvent également être classés en marqueurs moléculaires bien que ces derniers soient d’avantage référés à des marqueurs ADN (Jiang, 2013). Apparus vers les années 1970, les marqueurs biochimiques ont été largement utilisés en amélioration végétale (Bednorz et al., 2004 et Voylokov & Priyatki, 2004 in Dominguez-Garcia et al., 2012) et ont été les premiers marqueurs utilisés pour étudier la variabilité génétique (Myriam, 2008). La méthodologie nécessaire pour le développement et l'utilisation de ce type de marqueurs est relativement simple, rapide et économique (Trujillo et al., 1995). Les marqueurs protéiques les plus utilisés sont les protéines de réserve et les isoenzymes. Ces derniers sont des formes alternatives ou variantes structurelles d'une enzyme qui ont des poids moléculaires et mobilité électrophorétique différente avec une même activité ou fonction catalytique. Les isozymes reflètent les produits des allèles différents plutôt que des gènes différents ces derniers présentent généralement un bon polymorphisme, la substitution d’un seul acide aminé peut induire un changement de la mobilité électrophorétique en modifiant la charge ionique totale de la protéine (Xu, 2010). Les marqueurs isozymes peuvent être génétiquement cartographiés sur les chromosomes, puis utilisés comme des marqueurs génétiques pour cartographier d'autres gènes. Ils sont également utilisés dans les tests de pureté des semences et occasionnellement dans les tests de croisement végétal (Jiang, 2013). Par ailleurs, plusieurs travaux ont décrit les protéines de réserve comme des marqueurs génétiques puissants utilisés pour l’identification des cultivars et dans les études des liens phylogénétiques (Liang et al., 2006).

Toutefois, malgré que ces marqueurs soient généralement codominants (Tanksley & Orton, 2012), ils ont montré leurs limites pour l’identification des variétés étroitement apparentées (Ouazzani et al., 1995). Ces marqueurs présentent aussi l’inconvénient de révéler un faible nombre de loci ainsi qu’une certaine spécificité liée soit à leur expression par des organes et/ou à un stade de développement (Tagu & Moussard, 2006), en plus de leur expression différentielle suivant des facteurs environnementaux (Dominguez-Garcia et al., 2012) ce qui conduit à une sous-estimation du polymorphisme réel.

2.3.3. Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont le type de marqueur le plus largement utilisé, principalement en raison de leur abondance. Ils proviennent de différentes classes de mutations d'ADN telles que des mutations de substitution (mutations ponctuelles), des réarrangements (insertions ou délétions) ou des erreurs de réplication d'ADN répétées en tandem (Paterson, 1996). Ces marqueurs sont sélectivement neutres car ils sont généralement situés dans des régions non codantes de l'ADN d'un chromosome. Contrairement aux autres marqueurs, les marqueurs ADN sont en nombre illimité et ne sont pas affectés par les facteurs environnementaux et / ou le stade de développement de la plante (Winter & Kahl, 1995). Le tableau 2 présente une comparaison de diverses caractéristiques des marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés (Nadeem et al., 2018).

Tableau 2. Comparaison entre les caractéristiques des marqueurs moléculaires les plus utilisés (Nadeem et al., 2018).

Caractéristiques	RFLP	RAPD	AFLP	ISSR	SSR	SNP
Co-dominant / Dominant	Co-dominant	Dominant	Dominant	Dominant	Co-dominant	Co-dominant
Reproductibilité	Élevé	Élevé	Intermédiaire	Moyenne – Élevé	Élevé	Élevé
Niveau de polymorphisme	Moyen	Très élevé	Élevé	Élevé	Élevé	Élevé
Qualité de l'ADN requise	Élevé	Élevé	Élevé	Faible	Faible	Élevé
Quantité d'ADN requise	Élevé	Moyenne	Faible	Faible	Faible	Faible
Indice de marqueur	Faible	Élevé	Moyen	Moyen	Moyen	Élevé
Abondance dans le génome	Élevé	Très élevé	Très élevé	Moyenne	Moyenne	Très élevé
Coût	Élevé	Faible	Élevé	Élevé	Élevé	Variable
Séquençage	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui
Exigence de PCR	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Visualisation	Gel d'agarose	Radioactif	Gel d'agarose	Gel d'agarose	Gel d'agarose	SNP-VISTA
Quantité d'ADN requise (ng)	10000	20	500–1000	50	50	50

Les marqueurs ADN ont de nombreuses applications dans l'amélioration des plantes telles que la sélection assistée par les marqueurs moléculaires, l'évaluation du niveau de diversité génétique, la sélection parentale, l'identification et l'évaluation de la pureté des cultivars (Winter & Kahl, 1995 ; Viviana Becerra et al., 2010), l'étude de l'hétérozygotie et l'identification des régions génomiques, le rétrocroisement assisté par les marqueurs moléculaires, et la

construction des arbres phylogénétiques (Collard et Mackill, 2008).

Les marqueurs moléculaires peuvent être globalement divisés en trois classes en fonction de la méthode de leur détection : basée sur l'hybridation, sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et sur la séquence d'ADN. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) est un marqueur basé sur l'hybridation développé d'abord dans une étude génétique humaine au cours des années 1980 (Botstein et al., 1980 ; De Martinville et al., 1980). Plus tard, ce marqueur a été utilisé dans la recherche de la diversité génétique des plantes (Weber & Helentjaris, 1989). L'RFLP est basé sur la (les) variation (s) de la longueur des fragments d'ADN produits par digestion d'ADN génomique et l'hybridation à des marqueurs spécifiques (sondes) de deux ou plusieurs individus d'une espèce suivie d'une comparaison des résultats. L'RFLP a été largement utilisé pour comparer les génomes des principales familles de céréales telles que le seigle, le blé, le maïs, le sorgho, l'orge et le riz (Bennetzen, 2000 ; Dubcovsky et al., 2001). Les avantages de l'RFLP comprennent la détection d'un nombre illimité de locus, la codominance, ainsi que la robustesse et la fiabilité. Cependant, l'RFLP est une technique très coûteuse, qui prend beaucoup de temps et demande beaucoup de travail, ainsi qu'une très grande quantité d'ADN. Elle présente également un polymorphisme limité en particulier dans des lignées étroitement apparentées (Collard et al., 2005). À l'heure actuelle, les systèmes de marqueurs basés sur la polymérisation en chaîne (PCR) sont plus rapides et nécessitent moins de matériel végétal pour l'extraction d'ADN. L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) a été le premier marqueur basé sur la PCR en utilisant une machine PCR et de l'ADN génomique avec des amorces arbitraires (aléatoires) qui permettent la création de plusieurs copies de brins d'ADN (Welsh & McClelland, 1990 ; Jacobson & Hedrén, 2007). Les avantages de l'RAPD comprennent la rapidité, la simplicité et le faible coût. L'RAPD permet également d'amplifier plusieurs locus à partir d'une seule amorce en utilisant une petite quantité d'ADN. Cependant, les résultats de l'RAPD ne sont généralement pas reproductibles dans différents laboratoires et ne peuvent détecter que les caractères dominants d'intérêt (Collard et al., 2005).

Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) est une technique qui combine à la fois la PCR et la RFLP (Mohan et al., 1997). L'AFLP est générée par digestion de fragments amplifiés par PCR en utilisant des enzymes de restriction spécifiques qui coupent l'ADN au niveau ou à proximité d'un site de reconnaissance spécifique. L'AFLP est hautement reproductible, ce qui permet une génération rapide et une fréquence élevée des produits d'AFLP, ce qui en fait une technique intéressante pour identifier les polymorphismes et pour déterminer

les liens en analysant les individus d'une population en ségrégation (Mohan et al., 1997). Une autre classe de marqueurs moléculaires qui dépend de la disponibilité de courtes séquences répétées d'oligonucléotides dans le génome de plantes sont : les SSR, STS, SCAR, EST-SSR et les SNP. De nombreux auteurs ont décrit en détails ces techniques (Semagn et al., 2006 ; Mondini et al., 2009), le tableau 3 rapporte les avantages et les inconvénients des marqueurs génétiques les plus utilisés. Dans la partie suivante du document, nous nous intéressons uniquement à la technique des SSR utilisée pour l'étude de la diversité génétique de notre population d'arachide.

Tableau 3. Avantages et inconvénients des différents marqueurs génétiques (Nadeem et al., 2018).

Marqueurs	Avantages	Inconvénients	Références
Morphologique	<ul style="list-style-type: none"> - Caractérisé visuellement - Faible coût - Facile à étudier 	<ul style="list-style-type: none"> - Influencé par les stades de croissance des plantes - Influencé par l'environnement 	Eagles et al., 2001
Isozymes	<ul style="list-style-type: none"> - Pas besoin d'instrument spécifique - Facile à étudier - Co-dominant 	<ul style="list-style-type: none"> - Influencé par des facteurs environnementaux - Faible polymorphisme 	Mondini et al., 2009
RFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Pas besoin d'informations préalables de la séquence - Co-dominant 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite une grande quantité d'ADN pur - Coûteux - Long 	Madhumati, 2014
RAPD	<ul style="list-style-type: none"> - Facile à étudier - Nécessite une faible quantité d'ADN - Polymorphe 	<ul style="list-style-type: none"> - Dominant - Nécessite un ADN hautement purifié - Faible reproductibilité - Non spécifique au locus 	Jiang, 2013 Madhumati, 2014
AFLP	<ul style="list-style-type: none"> - Fiable - Reproductibilité élevée - Plus informatif 	<ul style="list-style-type: none"> - Marqueur dominant - Nécessite un ADN hautement purifié - Nécessite une grande quantité d'ADN pur 	Madhumati, 2014 Ridout & Donini, 1999
SSR	<ul style="list-style-type: none"> - Marqueur co-dominant - Nécessite une faible quantité d'ADN - Reproductibilité élevée 	<ul style="list-style-type: none"> - Coût de développement élevé - Présence de beaucoup d'allèles nuls - Présente beaucoup de cas d'homoplasie 	Zane et al., 2002 Kalia et al., 2011
ISSR	<ul style="list-style-type: none"> - Hautement polymorphe - Simple et facile à réaliser - Pas besoin d'informations préalables sur la séquence 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible reproductibilité - Nécessite un ADN pur - Les fragments ne sont pas de la même taille 	Moreno et al., 1998 Ng & Tan, 2015
SNP	<ul style="list-style-type: none"> - Rentable - Largement distribué dans le génome - Pas besoin d'informations préalables sur la séquence - Reproductibilité élevée - Marqueur co-dominant 	<ul style="list-style-type: none"> - Coût de développement élevé 	Jiang, 2013 Madhumati, 2014

➤ Cas des SSR

Les microsatellites, également connus sous le nom de Simple Sequence Repeats (SSR), sont des marqueurs basés sur la PCR développés par Litt & Luty, 1989. Ce sont des répétitions aléatoires en tandem de motifs nucléotidiques courts et simples composé de 2 à 8 pb (Armour et al., 1999), de 1 à 6 pb (Goldstein & Pollock, 1997) ou même de 1 à 5 pb (Hoelzel, 1998) (par ex. (GT) $_n$, (AAT) $_n$ ou (GATA) $_n$). Les SSR sont très variables et uniformément répartis dans tout le génome chez les eucaryotes, leur nombre d'unités répétées varie considérablement d'une espèce à l'autre et présentent souvent des niveaux élevés de polymorphisme inter- et intraspécifique, en particulier lorsque le nombre de répétitions en tandem est de 10 pb ou plus (Queller et al., 1993).

Les réactions de PCR réalisées pour identifier les régions SSR sont effectuées en présence d'amorces sens et anti-sens qui s'hybrident aux extrémités 5' et 3' de l'ADN matrice, respectivement. Le polymorphisme de cette région est apprécié en construisant des amorces PCR pour l'ADN délimitant la région microsatellite. Les régions des amorces ont tendance à être conservées au sein de l'espèce, même si parfois elles peuvent également être conservées à des niveaux taxonomiques plus élevés (Govindaraj et al., 2015).

Les fragments de PCR générés sont généralement séparés sur des gels de polyacrylamide en combinaison avec des systèmes de coloration AgNO₃ (Nitrate d'argent) (Fig.7 (c)), d'autoradiographie ou de détection fluorescente (Fig.7 (a)).

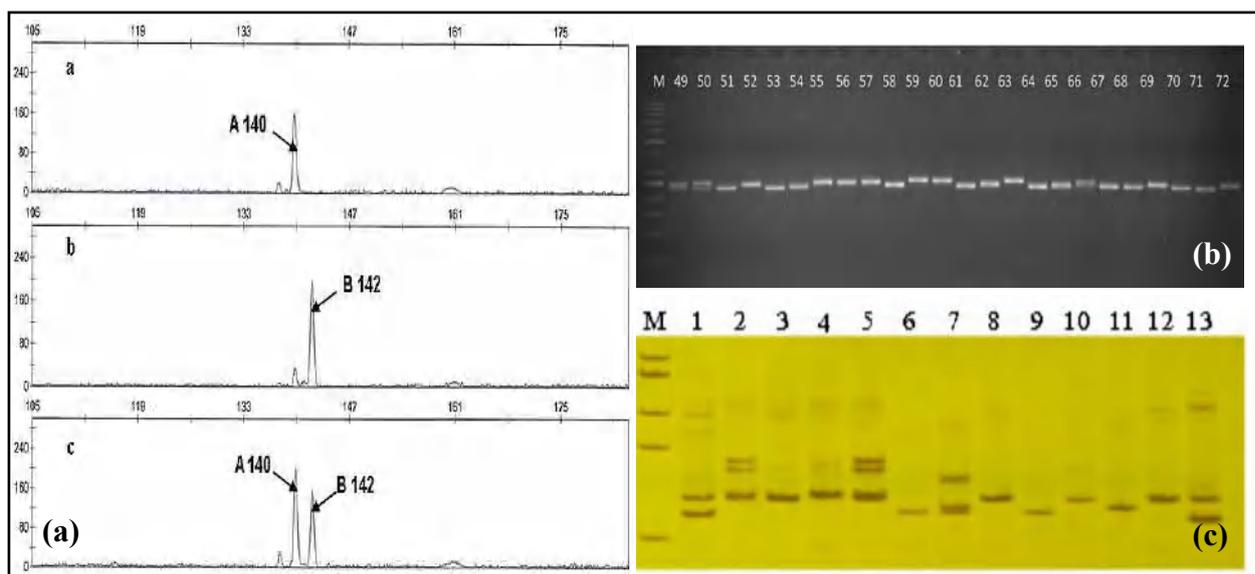


Figure 7. Exemples des méthodes de révélation des amplicons de microsatellites amplifiés pour différentes espèces (a) en utilisant des amorces fluorescentes, (b) sur gel d'agarose, (c) sur gel de polyacrylamide (Arif et al., 2010 ; Bohra et al., 2017 ; Song et al., 2010).

Des gels d'agarose (généralement de concentration supérieure à 3%) avec du bromure d'éthidium (EBr) peuvent également être utilisés lorsque les différences de taille d'allèle entre les échantillons sont supérieures à 10 pb (Fig.7 (b)). Cependant, la conception des amorces microsatellites pour une nouvelle espèce présente un défi technique considérable. Plusieurs protocoles ont été développés où les loci identifiés ont été généralement multialléliques et codominants (Hoelzel, 1998 ; Hammond et al., 1998). Les amorces identifiées peuvent souvent être utilisées avec de nombreuses variétés et même avec d'autres espèces car la région flanquante des microsatellites est le plus souvent très conservée avec une répartition uniforme dans tout le génome.

Les SSR se caractérisent également par un niveau de polymorphisme très élevé avec une bonne résolution analytique et une reproductibilité élevée, ce qui en fait un choix de marqueurs préférablement utilisé pour le génotypage individuel, l'évaluation du matériel génétique, les études de diversité génétique, la cartographie des gènes ainsi que les études phylogénétiques et évolutives (Matsuoka et al., 2002). Cependant, le développement de microsatellites nécessite une connaissance approfondie des séquences d'ADN, et sous-estime parfois les mesures de la structure génétique ; par conséquent, ces marqueurs sont largement utilisés pour les espèces agricoles cultivées, plutôt que pour les espèces sauvages (Mondini et al., 2009).

➤ **Analyse de la diversité génétique à partir de données moléculaires**

Les mesures de diversité génétique et de similitude sont très utiles pour décrire la structure génétique des populations. La structure génétique des populations naturelles d'une espèce végétale cultivée est fortement influencée par le système reproducteur de leurs individus et les types d'unions existant au sein des populations. Le choix des coefficients et des méthodes appropriés pour la structuration génétique d'une population dépend du système de marqueurs utilisé, des espèces étudiées, ainsi que des objectifs de l'étude préfixés (Bonin et al., 2007).

Le nombre d'allèles par locus, la fréquence allélique, l'hétérozygotie Nei (1973) et l'indice de fixation (F) de Wright (1965) sont largement utilisés pour résumer la structure génétique des populations et la distribution de la variation génétique à l'aide de marqueurs moléculaires codominants. Le nombre moyen effectif d'allèles par locus ainsi que l'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) sont les paramètres génétiques de population les plus couramment calculés pour la caractérisation de la diversité intra-population (Fig.8). Si on considère que p_i est la fréquence de l'allèle i à un locus donné, la diversité génétique calculée comme :

$H = 1 - \sum p_i^2$ est équivalente à l'hétérozygotie attendue. Ce paramètre peut être calculé pour des sous-populations uniques et la population dans son ensemble. Une analyse hiérarchique de la

variance avec estimation des statistiques F est ensuite généralement effectuée afin de mesurer le déficit ou l'excès d'hétérozygotie au sein des sous-populations (FIS) et entre sous-populations (FIT) ainsi que l'indice de fixation (FST) de la population totale. En particulier, le FST mesure l'effet de la subdivision totale de la population en différentes sous-populations et correspond à la réduction de l'hétérozygotie des sous-populations par rapport à la population dans son ensemble. Les estimations de similarité génétique (GS) entre les populations sont également très souvent calculées à l'aide de marqueurs moléculaires dominants. Ces estimations sont traditionnellement calculées dans toutes les comparaisons possibles par paires entre les individus au sein ou entre les populations en utilisant différents paramètres de similitude génétique (ex. l'indice de Dice, 1945) (Barcaccia, 2010).

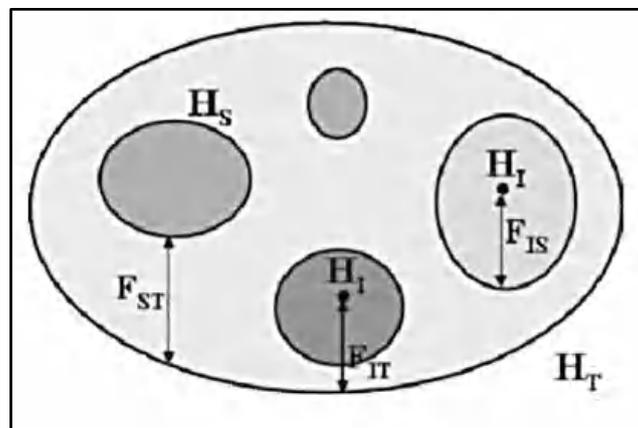


Figure 8. Indice de fixation (F) de Wright, (1965) pour évaluer la structure génétique des populations.

Cette estimation de la similitude génétique correspond à celle calculée par la formule de Nei & Li, (1979). Le coefficient Simple Matching (SM) est également très utilisé pour le calcul de la similitude génétique. Tout ensemble de diversités ou similitudes génétiques peut être analysé en termes de variation génétique au sein et entre les populations, et plus particulièrement en termes de contributions des plantes individuelles à la variabilité génétique totale. L'approche la plus couramment utilisée consiste à calculer une matrice de distances génétiques ou de similitudes, générant des dendrogrammes UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) et des centroïdes PCA (Principal Component Analysis) en plus d'une analyse de la variance moléculaire (AMOVA) (Govindaraj et al., 2015). Les populations et les individus prioritaires pour la conservation seraient donc ceux qui contribueraient le plus à la variation et à la différenciation de l'ensemble de matériel génétique.

Enfin, il est souvent souhaitable d'étudier également l'influence des facteurs géographiques ou environnementaux sur la répartition des groupes (Karp et al., 1997b ; Pritchard et al., 2000).

De nombreux logiciels sont disponibles pour évaluer la diversité génétique et la plupart d'entre eux sont disponibles gratuitement sur internet. Le tableau 4 décrit quelques exemples des logiciels les plus utilisés dans le cas des marqueurs SSR.

Tableau 4. Liste de quelques programmes analytiques pour mesurer la diversité moléculaire (génétique) pour les marqueurs SSR (Govindaraj et al., 2015).

Outils analytiques	Type de données	Référence
Arlequin	RFLP, séquences d'ADN, données SSR, fréquences d'allèles ou génotypes multilocus standard.	Schneider et al., (2000) Excoffier et al., (2005)
PowerMarker	SSR, SNP, et les données RFLP	Liu et Muse, (2005)
STRUCTURE	Tous les types de marqueurs, y compris les marqueurs les plus utilisés comme les SSR, les SNP, les RFLP, les dArT, etc.	Pritchard et al., (2000) Falush et al., (2003) Hubisz et al., (2009)
POPGENE	Données dominantes, codominantes et quantitatives pour l'analyse génétique des populations	Yeh et al., (1999)
GenAIEx	Données génétiques codominantes, haploïdes et binaires. Il prend en charge la gamme complète de marqueurs génétiques disponibles, y compris les allozymes, les SSR, les SNP, l'AFLP et d'autres marqueurs multilocus, ainsi que les séquences d'ADN	Peakall & Smouse, (2006)

2.3.4. Synthèse des travaux antérieurs sur l'utilisation des marques moléculaire dans les études de la diversité génétique de l'arachide cultivée

L'arachide cultivée présente une faible diversité à l'échelle moléculaire. Cette dernière a été attribuée à une polyploïdisation récente de l'espèce cultivée et une forte conservation du génome en dépit de la sélection (Young et al., 1996). Au cours de ces deux dernières décennies, d'importants efforts de recherche ont été investis pour le développement de marqueurs moléculaires et l'analyse de la diversité génétique de l'arachide. Kochert et al., (1991) ont utilisé des marqueurs RFLP pour étudier la variabilité génétique existante entre cultivars appartenant aux types commerciaux virginia, runner, valencia et spanish. Leurs résultats ont montré que la variation des profils RFLP entre cultivars était très faible. De même, plusieurs chercheurs (Lanham et al., 1992 ; Paik-Ro et al., 1992) ont utilisé les profils RAPD pour étudier

la diversité génétique de l'espèce cultivée de l'arachide. Cependant, leurs résultats n'ont montré aucune diversité génétique entre plusieurs cultivars et variétés.

Plus récemment, l'étude de génotypage de différentes variétés botaniques menée par He & Prakash, 1997 avait révélé un polymorphisme modeste en utilisant les marqueurs DAF (DNA amplification fingerprinting) et AFLP (0,11% et 0,17% respectivement). Singh et al., (1998) ont expliqué le faible polymorphisme observé dans le compartiment cultivé par l'inadéquation du matériel génétique utilisé dans les différentes études et ont préconisé l'utilisation d'une méthode d'échantillonnage plus rigoureuse et l'utilisation de marqueurs de type SSR ou AFLP.

Malgré que les marqueurs AFLP ont surmonté de nombreuses limitations des autres marqueurs moléculaires à savoir l'RAPD et l'RFLP, les marqueurs SSR demeurent un marqueur de choix pour les études de la diversité génétique des arachides grâce à l'évolution unique de ces régions génomiques : glissement de réplication plutôt que mutations, insertions ou délétions (Ashok Kumar, 2004). Hopkins et al., (1999) ont été l'une des premières équipes à développer des marqueurs SSR et à prouver leur efficacité pour détecter de la variation moléculaire dans le compartiment cultivé. He & Prakash, (2001) ont étudié la diversité génétique entre variétés botaniques à l'aide de marqueurs AFLP et leur lien avec la seule espèce tétraploïde sauvage décrite (*A. monticola*). Leurs résultats ont montré que les variétés botaniques *aequatoriana* et *peruviana* étaient plus proches de la sous-espèce *hypogaea* que de la sous-espèce *fastigiata* et que l'espèce sauvage *A. monticola* était très proche de la sous-espèce *hypogaea*. Raina et al., (2001) ont pu distinguer, avec des données combinées de marqueurs RAPD et ISSR, les différentes variétés botaniques et cultivars dont 21 appartenant à une même variété botanique. Cependant, il ressort de ces différentes études que la diversité génétique observée chez l'arachide cultivée demeure faible. Au début des années 2000, l'utilisation des outils de la génomique a permis une forte progression du nombre de marqueurs microsatellites utilisables chez l'arachide. Ces marqueurs ont été dérivés de banques enrichies en microsatellites (He et al., 2003 ; Cuc et al., 2008), de banques d'ADN génomique (Ferguson et al., 2004 ; Moretzsohn et al., 2004), de banques d'EST (Proite et al., 2007 ; Moretzsohn et al., 2009). Ils ont permis de préciser la structuration de la diversité génétique dans le compartiment cultivé et de confirmer la faible diversité génétique qui existe dans ce compartiment. En dépit du faible nombre de marqueurs polymorphes dans le compartiment cultivé, les premières cartes génétiques résultant de croisements entre variétés cultivées ont été construites (Varshney et al., 2009 ; Hong et al., 2010). Ces cartes génétiques, encore peu saturées, ont été utilisées pour réaliser des études de cartographie de QTL impliqués dans la tolérance à la sécheresse et

continue d'être une priorité scientifique des chercheurs jusqu'à nos jours (Pandey et al., 2021).

3. L'allergie alimentaire

3.1. Définition de l'allergie alimentaire

Le terme allergie alimentaire est utilisé pour décrire une réponse immunologique indésirable à une protéine alimentaire. Cependant, il est important de distinguer l'allergie alimentaire des autres effets indésirables non immuno-médiés aux aliments (Sicherer & Sampson, 2010). Les effets indésirables qui ne sont pas classés comme des allergies alimentaires comprennent les intolérances alimentaires secondaires à des troubles métaboliques (par exemple, intolérance au lactose), les réactions à des contaminants toxiques ou des composants alimentaires pharmacologiquement actifs (par exemple la caféine dans le café causant nervosité, tyramine dans les fromages vieillissants déclenchant la migraine) (Sampson, 2004 ; Sicherer & Sampson, 2010).

De nombreuses allergies alimentaires, en particulier les allergies au lait, aux œufs, au soja et au blé, sont généralement dépassées au cours des dix premières années de la vie (Wood, 2003). En revanche, les allergies aux arachides, aux noix, aux poissons et aux crustacés durent souvent toute la vie, bien que 20% des individus puissent surmonter l'allergie aux arachides (Phipatanakul & Wood, 1999). Les arachides et les noix sont responsables des réactions allergiques les plus graves et des décès liés aux allergies alimentaires (Macdougall et al., 2002).

3.2. Classification des allergies alimentaires

Les allergies alimentaires sont généralement classées en trois groupes comprenant ceux induits par les anticorps immunoglobulines E (IgE), induits par des mécanismes non liés aux IgE ou des réactions mixtes. Les réponses allergiques à médiation IgE sont la forme d'allergie alimentaire la plus largement reconnue et se caractérisent par l'apparition rapide de symptômes après l'ingestion (Fig.9) (Satitsuksanoa et al., 2018). Lors du premier contact avec l'aliment allergène, la consommation de la protéine alimentaire allergénique stimule la production d'anticorps IgE spécifiques. Ces derniers, lors du deuxième contact, se lient à leurs récepteurs spécifiques et déclenchent la libération de médiateurs, tels que l'histamine, les prostaglandines et les leucotriènes, provoquant des symptômes allergiques (Sampson, 2004 ; Sicherer, 2002).

En revanche, l'allergie alimentaire non médiée par les IgE (à médiation cellulaire) est moins fréquente et résulte de la génération des lymphocytes T qui répondent directement à la protéine, conduisant à la libération de médiateurs qui dirigent certaines réponses inflammatoires (par exemple, une inflammation éosinophile) et peuvent provoquer une variété d'états de maladies subaiguës et chroniques. Ces types de réactions affectent généralement le tractus gastro-

intestinal (GI) et la peau (Sampson, 2004 ; Sicherer & Sampson, 2010).

Enfin, les allergies alimentaires mixtes est une classe des allergies alimentaires médiées par des IgE et des cellules immunitaires à la fois (Waserman & Watson, 2011). Il est important à noter que depuis la classification des hypersensibilités alimentaires de Gel & Coombs, (1963), plusieurs auteurs ont proposé de nouveaux groupes de réaction alimentaire et/ou des réarrangements de la classification précédente (Pichler, 2004 ; Boettcher & Crowe, 2013).

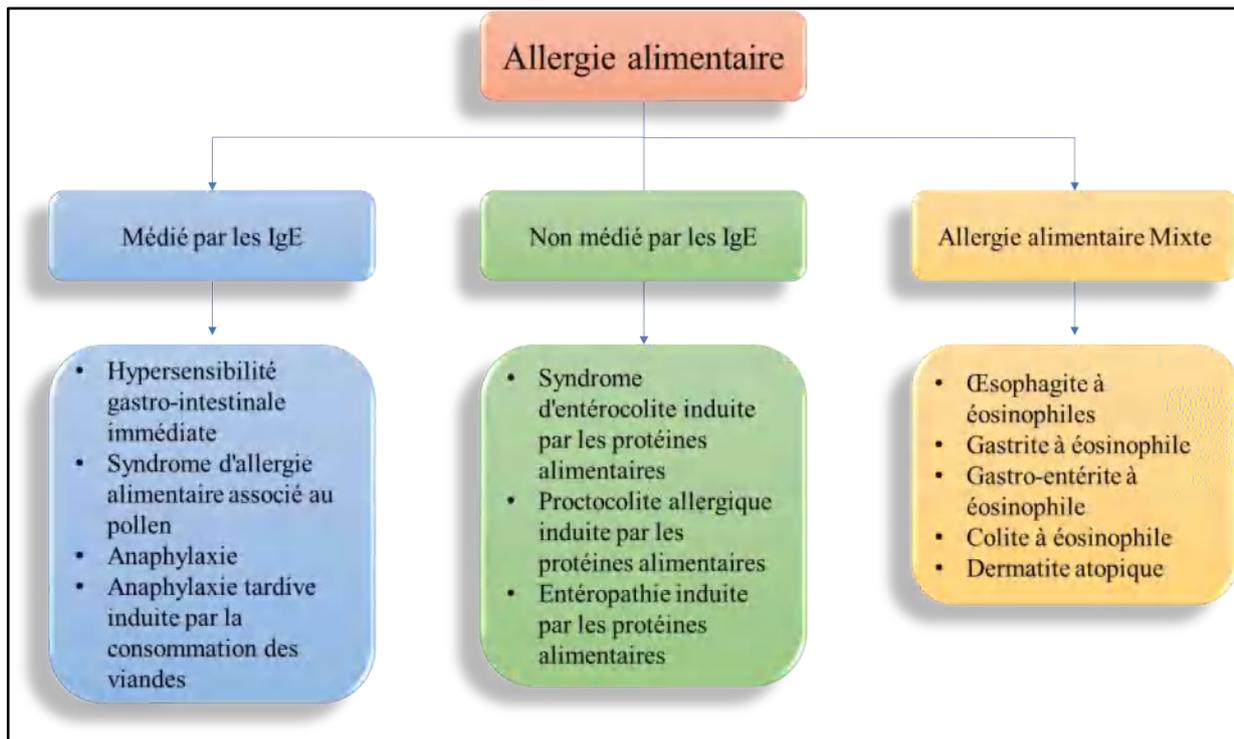


Figure 9. Classification des allergies alimentaires et les troubles associés (Satitsuksanoa et al., 2018).

3.3. Physiopathologie et symptomatologie des allergies alimentaires

Notre compréhension des raisons pour lesquelles certaines personnes développent une sensibilisation allergique aux antigènes alimentaires alors que la plupart des individus maintiennent une tolérance immunologique est très modeste. Cependant, un nombre croissant de preuves suggère que l'équilibre délicat entre la sensibilisation et la tolérance peut être affecté au moins en partie par quelques déterminants clés à savoir : les facteurs alimentaires, les doses et le moment de l'exposition à l'antigène, les propriétés de certains composants alimentaires allergènes, l'état du microbiote et la voie de sensibilisation (Fig.10) (Pelz & Bryce, 2015).

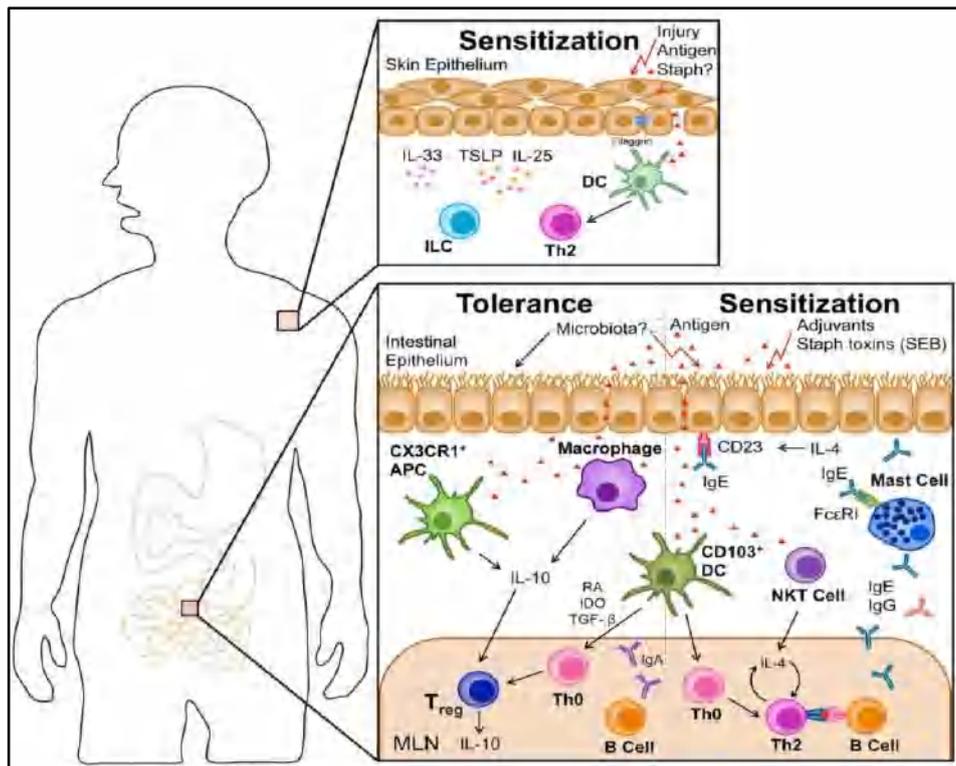


Figure 10. Voies de tolérance et de sensibilisation (Johnston et al., 2014).

La sensibilité d'un individu à un aliment est souvent caractérisée par la production d'anticorps IgE spécifiques à un allergène après une exposition à cet allergène. Elle implique l'amorçage des lymphocytes T après l'activation des cellules dendritiques (DC) (Pelz & Bryce, 2015). Les cellules T auxiliaires (Th) antigènes naïfs se différencient en cellules effectrices Th2 en présence d'interleukine 4. Un ensemble d'interleukines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13 sont massivement produits par les cellules Th2 et vont induire la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes produisant des IgE (Satitsuksanoa et al., 2018).

Les IgE produites se lient ensuite à leur récepteur de haute affinité FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles (Fig.11), armant ainsi ces cellules pour l'activation lors de la réexposition à l'antigène. Une fois la sensibilisation établie, la réexposition à l'antigène peut entraîner des manifestations locales ou systémiques (Fig.12 (a)).

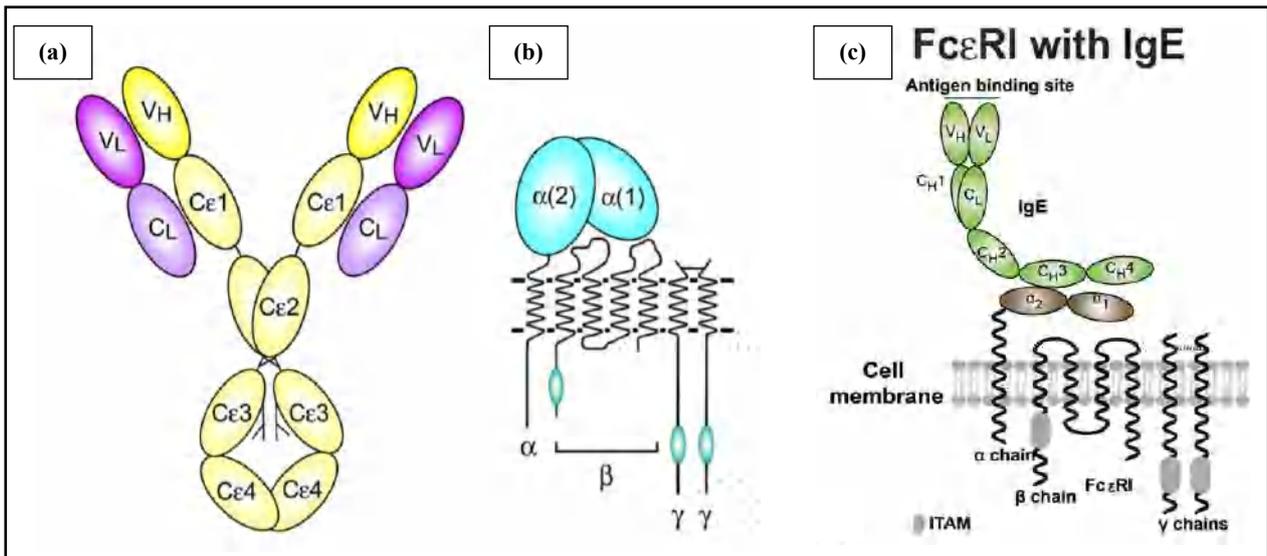


Figure 11. (a) Structure de l'immunoglobuline E, (b) Récepteur FcεRI des IgE (Sutton & Davies, 2015), (c) Fixation des IgE sur leurs récepteurs de haute affinité FcεRI (Hellman et al., 2017).

En effet, la sensibilisation à un antigène alimentaire particulier est une étape nécessaire dans la physiopathologie de l'allergie alimentaire, car les réactions allergiques alimentaires classiques sont à médiation IgE et conduisent aux manifestations de réactions d'hypersensibilité de type 1 (Fig.12 (b)), telles que l'urticaire, l'œdème de Quincke, le bronchospasme, l'hypotension et le choc anaphylactique. Cependant, il est crucial de souligner que la sensibilisation n'est pas suffisante pour la manifestation d'une allergie alimentaire. De nombreuses personnes peuvent produire des anticorps IgE (c'est-à-dire être sensibilisées) aux aliments qu'elles tolèrent cliniquement (Sampson, 2001). Lors du deuxième contact de la personne sensibilisée avec le même allergène, la reconnaissance de l'allergène conduit à la formation de la liaison des récepteurs qui se trouvent sur la surface des mastocytes FcεRI avec les IgE (Gould et al., 2003), permettant le déclenchement de la cascade de phosphorylation intracellulaire ce qui conduit à un afflux de calcium et à une dégranulation des mastocytes (Gould & Sutton, 2008), ces derniers libèrent plusieurs composés vasoactifs préformés, tels que l'histamine, la tryptase, la chymase, la carboxypeptidase, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et l'héparine (Galli & Tsai, 2010). Ces médiateurs provoquent les symptômes immédiats d'une réaction d'hypersensibilité de type I, qui peuvent inclure plusieurs symptômes à savoir l'urticaire, œdème de Quincke, bouffées de chaleur, respiration sifflante, toux, essoufflement, rhinorrhée, hypotension, pâleur, syncope, douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhée (Gould & Sutton, 2008).

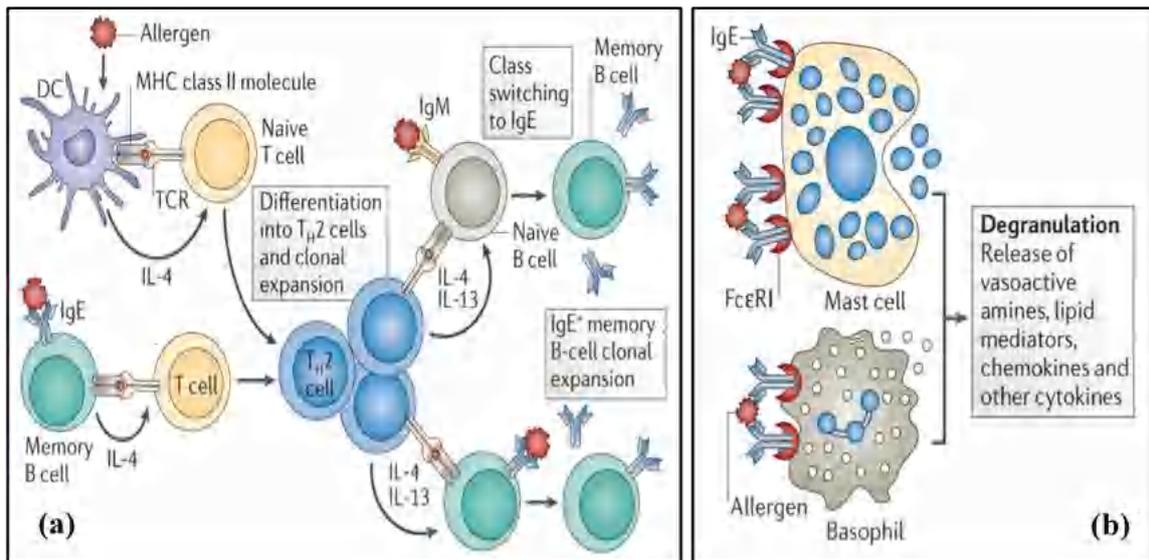


Figure 12. Mécanismes des réactions allergiques. **(a)** Phase de sensibilisation à l'allergène et développement de cellules B spécifiques et de cellules T mémoires. **(b)** Réaction d'hypersensibilité de type I (Larché et al., 2006).

Les mastocytes synthétisent également d'autres médiateurs lors de l'activation, y compris les cystéinyl leucotriènes et les prostaglandines, ainsi qu'une large gamme de cytokines et chimiokines immunorégulatrices. On pense que ces médiateurs jouent un rôle dans la réponse de phase tardive de l'anaphylaxie (les réactions biphasiques ou triphasiques potentielles observées en clinique) qui peuvent survenir plusieurs heures après l'exposition à l'antigène, car ces composés conduisent au recrutement et à l'activation de médiateurs inflammatoires, qui prennent plusieurs heures pour obtenir leur réponse effectrice (Gould & Sutton, 2008). Bien que les arachides, les noix et les crustacés soient généralement les coupables les plus responsables, l'anaphylaxie peut aussi être déclenchée par l'un des allergènes alimentaires courants (Connors & Waserman, 2010).

3.3.1 Symptômes cliniques de l'inflammation gastro-intestinale

Le tube digestif est constitué de quatre parties : le pharynx et l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle où s'effectuent la digestion et l'absorption des aliments et enfin le gros intestin qui comporte le caecum et le colon.

La muqueuse intestinale est considérée comme un filtre essentiel à l'absorption des nutriments ingérés (Goole, 2008). L'interaction de la muqueuse contre des éléments étrangers (bactéries, antigènes, toxines, virus) induit une réponse immunitaire innée et/ou adaptative (Cebra, 1999 ; Pascual et al., 2001). Sa structure est formée par les circonvolutions d'une couche de cellules épithéliales (entérocytes) (Foligne et al., 2003), qui se distribuent suivant un axe composé d'une villosité encerclée par 8 à 10 cryptes (Goole, 2008) (Fig.13).

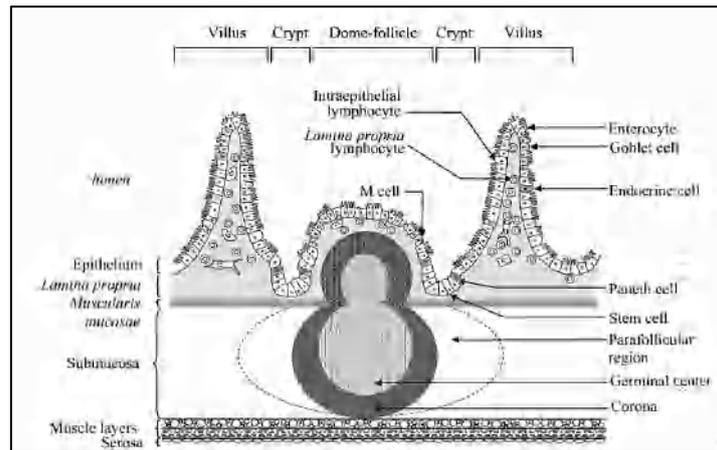


Figure 13. Organisation spatiale schématique du tissu lymphoïde associé à l'intestin (Fortun-Lamothe & Boullier, 2004).

L'inflammation est la première réaction qui perturbe les fonctions de l'axe villosité cryptes (Goole, 2008), elle se manifeste par une atrophie des villosités et une hyperplasie des cryptes (Moneret-Vautrin et al., 2001). L'augmentation de la perméabilité intestinale induite par une atrophie des villosités est accompagnée par une augmentation des lymphocytes intra-épithéliaux (Lachaux et al., 1994), et l'augmentation d'apoptose cellulaire qui diminue l'absorption des nutriments. La réduction des villosités, réduit la surface de digestion (De Vresse et al., 1992). On observe aussi un élargissement des cryptes (hyperplasie) (Ayabe et al., 2000 ; Goldman, 2000 ; Couderc et al., 2006) (Fig.14).

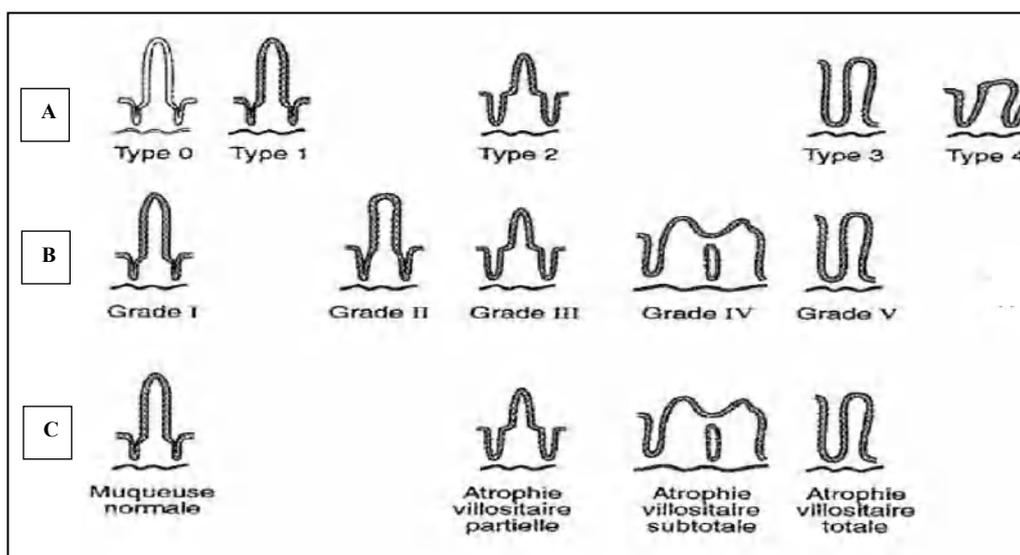


Figure 14. Classifications des atrophies villositaires. **A** - Marsh classification. **B** - Marche and Matuchansky's classification. **C** - N Brousse classification (Patey-Mariaud de Serre, 2000).

3.3.2. Rôle des cytokines dans la réaction allergique

Chez les personnes allergiques, la production des cytokines ; qui exercent de puissants effets promoteurs sur la prolifération et la différenciation, le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires ; est induite par les stimulations allergéniques répétées (Ponvert, 1999). Après activation par les allergènes, les cellules épithéliales libèrent des cytokines qui participent au déclenchement de la réponse allergique (activation IgE-dépendante des mastocytes, éosinophiles, basophiles et macrophages), la production des cytokines est aussi induite ou potentialisée par les médiateurs issus de l'activation de ces mêmes cellules (Froidure & Pilette, 2015), en retour, les cytokines contribuent à stimuler la production des médiateurs de l'allergie et de l'inflammation. Il se produit ainsi un cercle vicieux d'auto-entretien de la réaction inflammatoire (Ponvert, 1999). Plusieurs travaux ont étudié le rôle déterminant des cytokines dans la régulation de la synthèse des IgE. Il a été démontré également que chez les atopiques, la production exagérée de ces anticorps résultait pour l'essentiel d'une production anormalement importante des cytokines du type Th2, interleukines 4, 10 et 13 notamment, et d'un déficit relatif de la production d'IL-12 et des cytokines du type Th1 (IFN- γ tout particulièrement) (Ponvert, 1999 ; Froidure & Pilette, 2015).

3.3.3. Fonction des cellules Th1 et Th2

Les cellules Th1 sont impliquées dans les réactions inflammatoires à médiation cellulaire comme les réactions d'hypersensibilité retardée ou l'élimination d'agents pathogènes intracellulaires. Cette immunité est caractérisée par l'activation des macrophages et la production de lymphocytes T cytotoxiques (Ito et al., 1997). Les cellules Th1 induisent des réponses immunitaires protectrices en favorisant la production d'anticorps dominée par l'isotype IgG2a chez la souris (Cavaillon et al., 1996).

Les lymphocytes Th2 sont des cellules présentes en cas d'infection parasitaire ou d'allergies. Ces cellules produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. L'IL-5 stimule la différenciation des éosinophiles alors que l'IL-4 et l'IL-13 agissent sur la contraction des muscles et la production de mucus de l'intestin (Sokol et al., 2008). L'IL-4 permet aussi de stimuler les lymphocytes B vers la production d'IgE et IgG1 chez la souris et d'IgE et d'IgG4 chez l'Homme (Murray, 1998 ; Sedlik, 1996). L'IL-5 est pour sa part, une cytokine permettant l'activation des éosinophiles mais également capable d'amplifier la production d'IgE. Ainsi, les cytokines de type Th2 sont fréquemment retrouvées dans les processus allergiques et dans les réponses à forte sécrétion en anticorps (Mosmann & Sad, 1996).

La description des sous-types 1 et 2 des lymphocytes auxiliaires chez la souris a permis de proposer chez l'homme une explication à l'inflammation observée dans le cas des allergies alimentaires ainsi qu'à sa relation avec l'atopie. Les différences fonctionnelles entre lymphocytes Th1 et Th2 ont également permis de proposer une explication à l'augmentation récente de la prévalence des maladies allergiques. Cette approche conduirait à développer des stratégies thérapeutiques inhibant la réponse Th2 associée à la production d'IgE et à l'inflammation due aux éosinophiles et à stimuler la réponse Th1 associée à la défense anti-infectieuse.

3.4. L'allergie à l'arachide

3.4.1. Importance de l'allergie à l'arachide

L'allergie aux arachides est une maladie à médiation IgE qui affecte environ 1% des enfants de moins de 5 ans (Sampson, 2004 ; Lee & Burks, 2006). Au cours des 15 dernières années, un nombre croissant d'enfants ont reçu un diagnostic d'allergie alimentaire (Sampson, 2002 ; Grundy et al., 2002). Bien que tout aliment puisse potentiellement provoquer une réaction allergique, quelques-uns provoquent la plupart des réactions allergiques. Chez les enfants et les adultes, les arachides, les noix, les poissons et les crustacés sont des allergènes courants (Sampson, 2004 ; Lee & Burks, 2006).

L'allergie alimentaire à l'arachide revêt une importance particulière car elle apparaît très tôt dans la vie, ne disparaît pas avec l'âge et est responsable des manifestations cliniques parfois très grave. L'organe cible le plus fréquemment impliqué dans l'allergie aux arachides est le tractus gastro-intestinal. Près de 100% des patients allergiques présentent des réactions allergiques au niveau de la peau péri-orale et de la muqueuse oropharyngée. Les autres principaux organes cibles allergiques comprennent la peau et le système respiratoire. Parfois, l'allergie aux arachides peut provoquer un choc anaphylactique et mettre la vie en danger (Xue et al., 2016). Une des difficultés de cette pathologie est de respecter une stricte éviction de ce produit. La quantité de protéines provoquant la réaction allergique est très faible par rapport aux autres aliments (Moneret-Vautrin et al., 1997 ; Flinterman et al., 2006). Peeters et al., 2007, ont déterminé que la dose-seuil au-dessous de laquelle aucun symptôme n'est observé dans une population d'allergiques est de 10 µg. Des personnes allergiques à l'arachide le sont aussi aux amandes (50 %), cajous (40 %), pistaches (30 %), noix du Brésil (26 %) et noisettes (21 %). D'autres réactions croisées peuvent avoir lieu avec des légumineuses comme les lentilles, le soja et le haricot (Bernhisel-Broadbent & Sampson, 1989).

La prévalence de l'allergie à l'arachide a fortement augmenté ces dernières années dans différents pays (Tab.5) (Grundy et al., 2002 ; Sicherer et al., 2003). Un certain nombre de facteurs ont été suggérés pour expliquer l'augmentation apparente de la prévalence tel que la demande croissante d'aliments hautement nutritifs et « à énergie rapide » a fait de l'arachide un aliment de base de l'alimentation des pays occidentaux. D'un autre côté, l'allaitement est de plus en plus courant et les produits à base d'arachide sont de plus en plus présentés comme d'excellentes sources nutritionnelles pour les femmes enceintes et allaitantes (Sampson, 2002).

Tableau 5. Prévalence de l'allergie alimentaire (Boudraa, 2015).

Pays	Année	Prévalence %
USA	2009	4-5
Danemark	1999	2,3 (à 3 ans)
France	2005	4,7 (3 à 15 ans)
UK, île de Wight	2004	1,6 (à 6 ans)
UK, île de Wight	2008	5 (à 3 ans)
Hong-Kong	2008	4,6 (2- 7 ans)
Alger	2014	1,75(5- 18 ans)

En Algérie, Abdellaziz et al., (2014) ont mené une étude transversale, descriptive par questionnaire sur les établissements scolaires de la région ouest de la wilaya d'Alger, pour déterminer le taux de prévalence de l'allergie alimentaire parmi les enfants scolarisés, où deux milles cinq cent questionnaires ont été distribués dans 63 établissements scolaires. Les résultats ont montré que la prévalence de l'allergie alimentaire chez l'enfant scolarisé à Alger est à 1,75 % où les aliments les plus fréquemment en cause ont été les légumineuses (arachide et lentille), ainsi que le poisson et les fruits de mer.

3.4.2. Méthodes de diagnostic de l'allergie à l'arachide

Il existe de nombreuses méthodes pour évaluer l'allergénicité des protéines d'un aliment, elles sont classifiées en tests *in vivo* et test *in vitro*. Les tests *in vivo* comprennent le test cutané et les provocations alimentaires contrôlées ; les tests *in vitro* comprennent le test de libération d'histamine et le test du dosage d'IgE couramment utilisé.

3.4.2.1. Les tests *in vivo*

a. Le test cutané

Le but de test cutané est de démontrer la présence d'IgE spécifiques d'un allergène fixées aux mastocytes cutanés. Lorsque l'allergène approprié active les mastocytes, ces derniers libèrent des médiateurs vasoactifs responsables d'un œdème ou papule, d'un érythème et d'un prurit. L'ensemble de ces trois signes forme la triade de Lewis. L'ensemble des symptômes débute cinq minutes après l'application du test et présente une réaction maximale entre dix et vingt minutes (Xue et al., 2016). L'examen cutané de l'allergie à l'arachide est effectué par 3 méthodes différentes à savoir : le Prick test, le Patch test, et le Prick-prick.

- Le Prick test

Ce test est répandu depuis 1970, le principe du test consiste à ce qu'on place une petite goutte d'extrait allergénique glycéринé à la surface de l'avant-bras ou du dos (Lamireau & Enaud, 2020), puis à l'aide d'une aiguille standardisée on pique au centre de la goutte. En effet, la pointe pénétrant dans le derme sans saigner et ne dépasse pas un millimètre (Molina, 1995), par ce moyen la quantité de l'allergène qui pénètre dans la peau est nettement définie (Navarro & Schmitz, 1993). Par le même système le médecin allergologue injecte une faible quantité d'histamine et de sulfate de codéine qui servent de témoins positifs.

- Le patch test

L'allergologue peut utiliser le patch test en présence d'une dermatite atopique. Cependant, l'absence d'extrait et de tests standardisés en vue de cette technique en limite les indications (Rancé & Dutau, 1998).

- Prick-prick test

Cette variante du prick test décrite par Dreborg et Foucard en 1983 consiste à piquer l'aliment puis à piquer le derme du patient avec la même aiguille. Le prick test est un test sensible et spécifique (Dreborg & Foucard, 1983). Si les prick tests sont négatifs, les tests biologiques sont déconseillés car ils risquent de mettre en évidence des IgE spécifiques n'ayant aucune incidence clinique. Dans le cas contraire, (Diamètre supérieur à trois millimètres) et que la clinique est concordante, l'enquête biologique ne sera pas envisagée.

b. Le test de provocation orale

Le test de provocation orale est un outil de diagnostic indispensable pour les allergies alimentaires. En pratique clinique, des tests de provocations se font sous surveillance médicale pour diagnostiquer et confirmer l'allergie alimentaire ou pour déterminer la tolérance ou la résolution d'une allergie à un aliment qui a été évitée. Dans les études de recherche, le test de

provocation orale permet de mieux comprendre la physiopathologie et les manifestations cliniques et d'évaluer les réponses à de nouvelles immunothérapies (Cox & Nowak-Wegrzyn, 2018).

c. Le test de provocation labiale

Le test de provocation labiale utilise les caractéristiques anatomiques des lèvres : importante vascularisation, richesse en mastocytes et faible kératinisation du versant externe (Rance & Dutau, 1997). Il s'agit d'un test de contact de l'aliment avec la muqueuse labiale dont le but est de produire des réactions locales, reflet de l'expression de la réponse IgE à l'allergène. Le test consiste donc à appliquer pendant une durée de dix secondes à deux minutes, selon le risque encouru, l'extrait alimentaire sur la commissure externe de la lèvre inférieure. La bouche doit rester entrouverte, à l'aide d'un morceau de coton interposé entre la gencive et la lèvre inférieure. Le patient ne doit pas parler durant l'application de l'aliment. Il peut utiliser l'extrait commercial ou l'aliment frais (Rance & Dutau, 1997).

3.4.2.2. Les tests *in vitro*

a. Test de libération de l'histamine

Les tests cellulaires mettent les basophiles du patient au contact d'un extrait du produit à tester. La réactivité cellulaire s'exprime sous la forme de libération d'histamine et de leucotriènes, par l'expression de marqueurs cellulaires (CD63, etc.) (James et al., 1993). Les niveaux d'histamine peuvent être déterminés avec un test de fluorescence ou un dosage radio-immunologique ; les résultats sont comparés à un témoin approprié pour déterminer la norme de vitesse de libération d'histamine positive, déterminant et identifiant ainsi l'activité allergénique (Xue et al., 2016). Du fait du pontage au moins bivalent nécessaire à cette réactivité, ces tests sont censés traduire de façon plus fidèle les réactions cliniques que les tests basés sur la détection d'une réactivité IgE sérique. Les tests sériques détectent en effet des liaisons monovalentes entre les IgE du patient et les épitopes présents dans le test, puisque les IgE sont libres dans le sérum (Moneret-Vautrin et al., 1999).

b. Etude de la liaison IgE-allergène

Le but de ce test est de mettre en évidence des IgE spécifique de l'arachide dans le sérum des patients. Par définition, les « dosages d'IgE spécifiques » s'adressent aux réactions à médiation IgE (ou IgE-dépendante). Ils n'explorent donc qu'une partie des maladies allergiques : l'allergie IgE-dépendante. Le dosage des IgE totales fait appel à un anticorps reconnaissant la chaîne lourde ϵ des immunoglobulines E présentes dans le sérum du patient (Fig.11(a)). Le

résultat de ce dosage représente la concentration pondérale en IgE mais n'est pas la somme des réactivités immunologiques du patient vis-à-vis des produits allergisants.

- Les immunoempreintes

Les immunoempreintes (ou immuno-blots) cherchent à mieux préciser l'origine de l'IgE-réactivité sérique du patient vis-à-vis d'un produit allergisant donné. Ces tests comportent une étape initiale de séparation électrophorétique des protéines contenues dans le produit à tester. L'incubation avec le sérum du patient puis avec un anti-IgE marqué permet ensuite de révéler l'IgE-réactivité sous forme de « bandes ». La position de ces dernières, le long d'une échelle de masse en kDa, peut indiquer la réactivité du patient vis-à-vis de tel ou tel allergène dans le produit (Fig.15). Les immunoempreintes bidimensionnelles sont plus résolutive : elles sont encore du domaine de la recherche (Moneret-Vautrin et al., 2011 ; Xue et al., 2016).

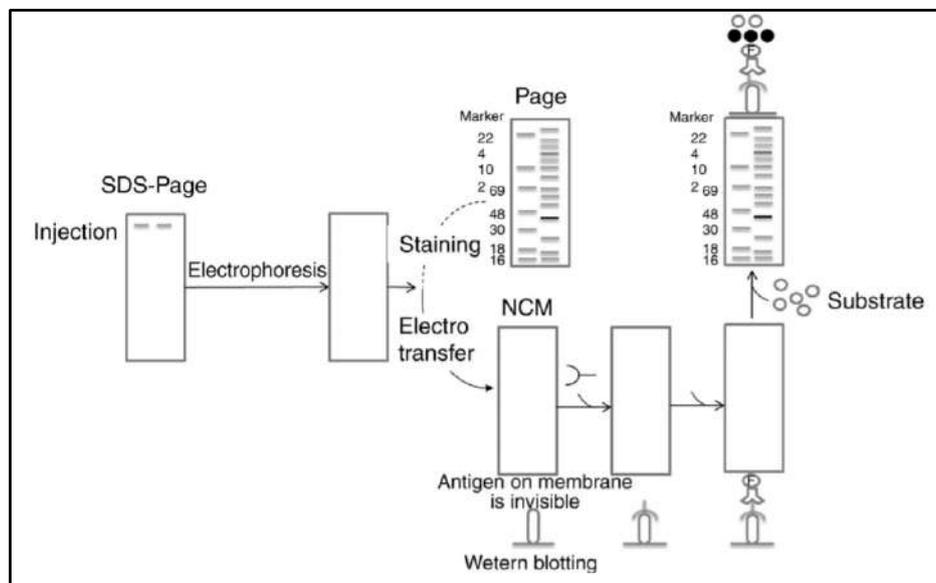


Figure 15. Diagramme schématisé du test d'immunoempreinte (Xue et al., 2016).

- Dosage des IgE sériques

Le dosage des IgE spécifiques dans le sérum du patient est réalisé par des techniques traditionnellement dénommées « RAST » (Radio Allergo-Sorbent Test) en référence à la première technique développée (Wide et al., 1967). L'allergène, fixé à un support solide (plaques 96 puits, puces, ...), est incubé avec le sérum à tester et les IgE spécifiques liées à cet allergène sont révélées par un anticorps anti-IgE marqué (Fig.16).

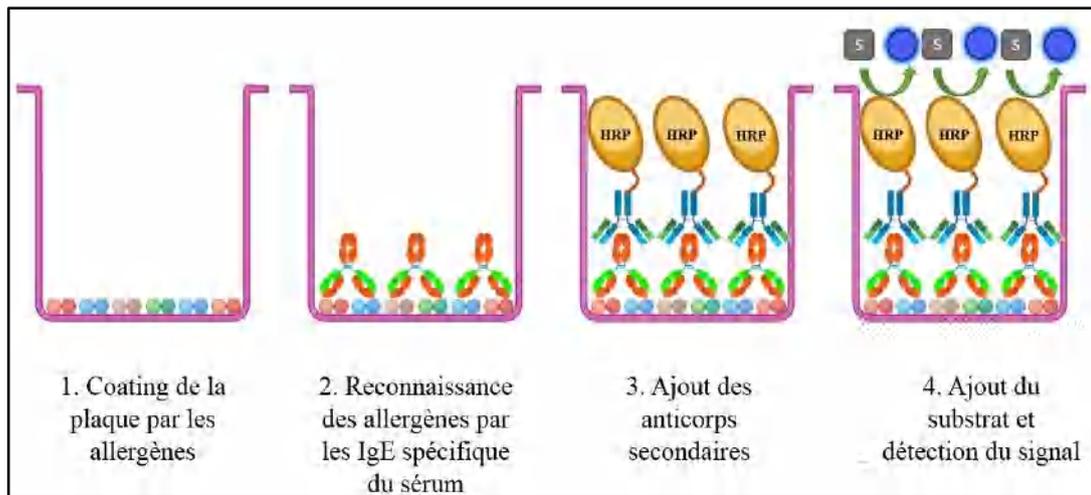


Figure 16. Principe de la technique ELISA de type indirect.

Le marqueur radio-isotopique, initialement utilisé, est désormais remplacé par des marqueurs fluorescents ou enzymatiques (Enzyme AllergoSorbent Test (EAST)). Les taux d'IgE mesurés sont exprimés en unités internationales par millilitre (UI/mL) ou en kilo-unités par litre (kU/L) (1 UI ou U correspondant à 2,4 ng d'IgE). Ces dosages sont semi-quantitatifs et utilisent une gamme étalon réalisée sur une phase solide revêtue d'un anticorps anti-IgE complémentaire de l'anticorps de révélation (Sampson & Ho, 1997).

3.4.3. Les allergènes de l'arachide

3.4.3.1. Définition et nomenclature

Les allergènes sont des antigènes reconnus par les IgE et capables d'induire une réponse immunitaire dite « allergique » liée à la synthèse d'IgE spécifiques. Les allergènes alimentaires sont appelés trophallergènes par opposition aux allergènes respiratoires, les pneumallergènes. Les trophallergènes sont des protéines ou glycoprotéines à point isoélectrique acide (pI) avec un poids moléculaire de 10 à 70 kDa (Lehrer et al., 1996). Les premières études sur l'arachide avaient permis de décrire deux protéines majeures, l'arachine et la conarachine. L'arachine se présente sous forme d'un complexe protéique de masse moléculaire égale à 170 kDa. Elle existe sous 2 formes polymorphiques A et B qui peuvent être dissociées en sous-unités de masses moléculaires s'étalant entre 20 et 71 kDa. La conarachine peut être séparée en 2 constituants, I et II, de masses moléculaires respectives 142 et 295 kDa (Mondoulet, 2005). Nous retrouvons majoritairement des protéines de réserve appartenant aux deux grandes familles des globulines 7S et 11S (viciline et glycinine) et des albumines 2S (conglutine). Outre ces protéines quantitativement majeures, l'arachide possède plus de 30 protéines différentes (Blanc, 2008).

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses protéines de l'arachide ont été caractérisées et identifiées comme étant des allergènes de l'arachide, c'est-à-dire reconnues par les IgE de patients allergiques à l'arachide. A ce jour, les allergènes de l'arachide identifiés sont au nombre de 13 (Tab.6) et sont désignés par les symboles Ara h 1 à Ara h 13 selon la nomenclature de l'IUIS (International Union of Immunological Societies) (Finkelman, 2010). Ces noms sont issus des trois premières lettres du nom du genre (*Arachis*), de la première lettre du nom de l'espèce (*hypogaea*) suivi d'un chiffre qui correspond à l'ordre chronologique de leur identification. Les allergènes de l'arachide sont des protéines de réserve (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4, Ara h 6, Ara h 7, la lectine de l'arachide PNA pour PeaNut Agglutinin, aussi dénommée Ara h agglutinin), des protéines structurales comme les oléosines (Ara h 10 et Ara h 11) et les profilines (Ara h 5), des protéines de transfert des lipides ou LTP (Ara h 9), et des protéines de défense de la plante contre les phytopathogènes (Ara h 8 une Bet v 1 - like), et de petites protéines (8 kDa), les défensines, impliquées dans la défense des plantes (Ara h 12 et Ara h 13). Les protéines de réserves sont les plus abondantes et sont réparties uniformément au sein des cotylédons (Peeters et al., 2007 ; Lieberman et al., 2013 ; Agabriel et al., 2014).

Tableau 6. Protéines allergènes de l'arachide (*Arachis hypogaea*) (Bouakkadia et al., 2015).

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

* Allergènes répertoriés par International union of immunological societies (IUIS).

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

Bouakkadia et al., (2015) ont déterminé les caractéristiques des protéines allergènes non-hydrosolubles de l'arachide obtenues par extraction en détergent et agents chaotropiques. La technique de l'immunoprotéomique a permis d'identifier non seulement les allergènes majeurs de pertinence clinique mais aussi 10 protéines jamais décrites en tant qu'allergènes dans cette légumineuse. Trois d'entre elles ont des homologues allergéniques dans d'autres organismes correspondant à des protéines ressemblant à Fus c 3, Asp f PUP ou Dio p TSP et Asp f IPMI. L'allergénicité de l'arachide sous sa forme grillée est supérieure à celle sous la forme crue ou bouillie (Beyer et al., 2001). Le rôissage des cacahuètes contribue à augmenter l'affinité des IgE vis-à-vis des épitopes. (Maleki et al., 2003).

3.4.3.2. Classification et caractéristiques des allergènes de l'arachide

Les allergènes d'un aliment sont classifiés en deux groupes selon leur fréquence de reconnaissance par les IgE d'une population de patients allergiques à cet aliment. Un allergène est décrit comme majeur lorsque plus de 50% des patients allergiques à la source alimentaire en cause possèdent des IgE spécifiques de cet allergène. En dessous de cette fréquence, on parle d'allergène mineur. A ce jour, de très nombreux allergènes ont été détectés dans la graine d'arachide, l'ensemble des allergènes décrits représente plus de 75% des protéines de l'arachide. La plupart des allergènes de l'arachide peuvent donc être décrits comme des allergènes majeurs suivant la définition énoncée et les données de la littérature. Ainsi, Ara h 1, Ara h 2, Ara h 6 et Ara h 3 sont des allergènes majeurs (Fig.17) (Mondoulet, 2005).

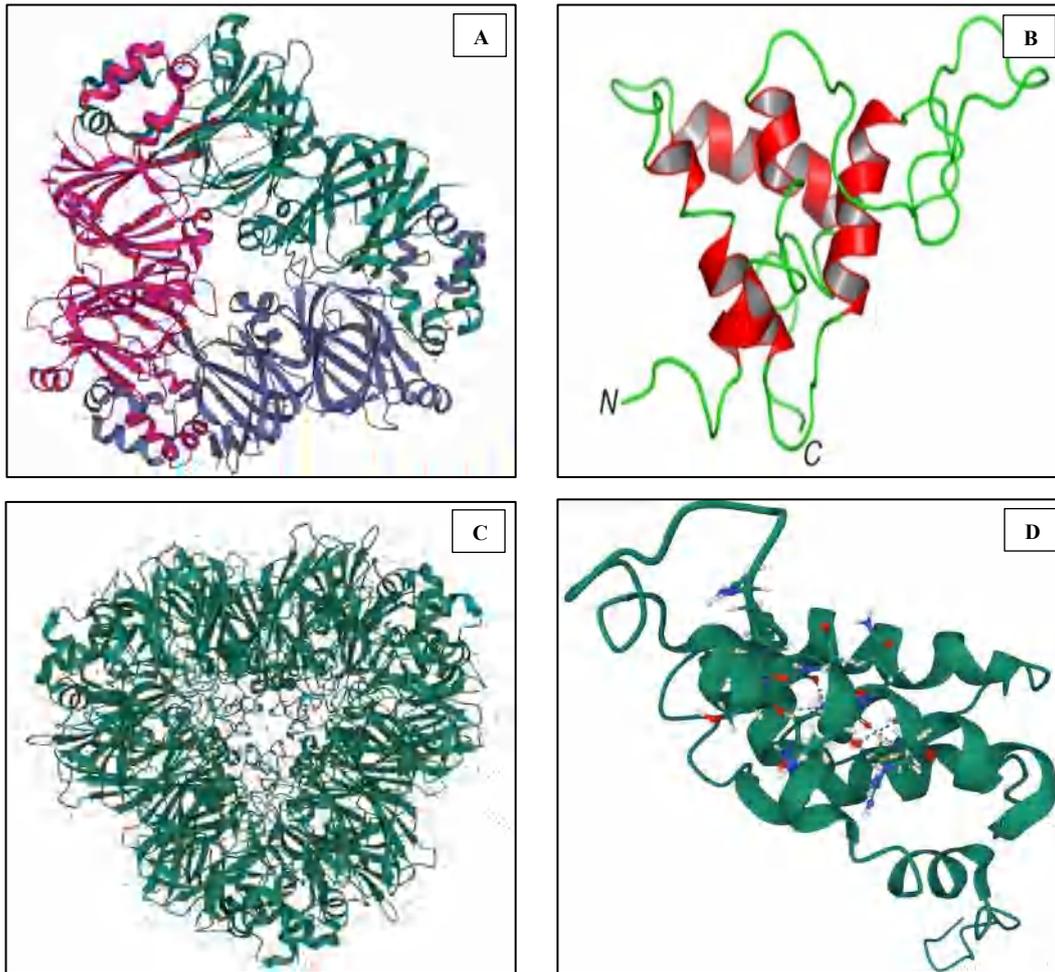


Figure 17. Structure tridimensionnelle des allergènes majeurs de l'arachide **(A)** Ara h1 (Cabanos et al., 2011), **(B)** Ara h2 (Barre et al., 2005), **(C)** Ara h3 (Jin et al., 2009), **(D)** Ara h6 (Lehmann et al., 2006).

L'immunoréactivité d'un allergène réside dans sa capacité à induire une réponse immunitaire caractérisée par la synthèse d'IgE spécifiques. Ce caractère immunogène est dû à la présence de déterminants antigéniques répartis à la surface de la protéine. Ils sont de deux sortes : Les épitopes B, qui sont généralement des épitopes conformationnels de 16 à 20 acides aminés, interviennent dans les mécanismes où l'antigène natif est reconnu par le fragment Fab des immunoglobulines de type E. Les épitopes T, petits peptides de 8 à 9 acides aminés sont reconnus par le récepteur T et induisent une différenciation des Th0 vers la voie Th2.

L'allergène Ara h1 représente une fraction immunoréactive qui possède un poids moléculaire de 63 kDa et un pHi de 4,5 (Burks, 1991). Il appartient à la famille des globulines 7S (viciline). Les études d'immunoréactivité avec des sérums de patients allergiques ont montré qu'Ara h 1 est un allergène majeur de l'arachide : près de 90% des sérums de patients

allergiques possèdent des IgE spécifiques de cette protéine (Burks, 1991 ; Kleber-Janke, 1999). C'est l'un des allergènes de l'arachide les mieux connus et les plus étudiés. Ara h 1 représente près de 12 à 16% des protéines de l'arachide (Koppelman et al., 2001), et en est ainsi l'allergène majoritaire. Cette glycoprotéine de 63 kDa par monomère possède de nombreux épitopes.

En 1992, Burks et coll. ont isolé et caractérisé un autre allergène de l'arachide, appelé Ara h 2. Ce dernier, appartient à la famille des albumines 2S (conglutines), et se présente en électrophorèse sur gel de polyacrylamide comme un doublet à 16,67 et 18,05 kDa (Chatel et al., 2003). Ces doublets correspondent à deux isoformes qui se distinguent par la présence/absence d'une séquence de 12 acides aminés. Ara h 2 est reconnue par les IgE de plus de 80% de patients allergiques à l'arachide (Burks et al., 1992 ; Flinterman et al., 2007), ce qui fait de cette protéine un autre allergène majeur de l'arachide. Récemment, Ara h 6, une autre albumine 2S, a également été décrite comme étant un allergène majeur reconnu par 80 à 95 % des patients allergiques (Bernard et al., 2007 ; Flinterman et al., 2007). Il a été montré par Bernard et coll. que Ara h 6 présente naturellement un polymorphisme dans la graine d'arachide. Une isoforme de Ara h 6 a été caractérisée ainsi qu'un de ses produits issus d'une protéolyse naturelle lors de la maturation de la graine d'arachide. Cette maturation entraîne la formation d'un hétérodimère dont la structure est maintenue par des ponts disulfures. La reconnaissance de Ara h 6 par les IgE de patients allergiques n'est pas modifiée par cette maturation naturelle, tandis qu'une perte drastique de la liaison aux IgE humaines est observée lorsque ces isoformes sont réduites chimiquement. Ces résultats suggèrent donc que l'allergénicité de Ara h 6 dépend fortement du maintien de sa conformation tridimensionnelle grâce à ses ponts disulfures (Bernard et al., 2007). Des protéines de la famille des globulines 11S (glycinines) ont également été identifiées comme allergènes de l'arachide. Ara h 3, qui a été tout d'abord identifiée par une approche de biologie moléculaire, présente une masse moléculaire de 58 kDa et un pHi de 5,5 (Rabjohn et al., 1999). Ara h 4, de masse moléculaire 36 kDa, est une isoforme de Ara h 3, possédant 91% d'homologie avec cette dernière (Kleber-Janke, 1999). Cependant les glycinines dans l'arachide n'existent pas sous une forme entière ou associée. Ara h 3/4 est naturellement présente dans la plante sous forme de polypeptides de 14 à 45 kDa, résultant d'une protéolyse naturelle au cours de la maturation de la plante (Koppelman et al., 2003).

Selon les études se basant sur des formes naturelles ou recombinantes, cette protéine est reconnue par 35 à 55% des IgE de sérums de patients allergiques à l'arachide (Kleber-Janke, 1999 ; Koppelman et al., 2004 ; Flinterman et al., 2007). De nombreux épitopes ont été

identifiés sur ces protéines, les IgE des patients allergiques en reconnaissant souvent plusieurs d'un même allergène (Burks et al., 2004 ; Stanley et al., 1997). Cependant, la comparaison de la réactivité de ces allergènes purifiés semble établir un classement suivant leur potentiel allergénique. Dans ces études, la réactivité est évaluée *in vitro* par la capacité de liaison aux IgE de patients allergiques (Bernard et al., 2007 ; Flinterman et al., 2007) et dans des tests de dégranulation de cellules effectrices (Koppelman et al., 2004 ; Palmer et al., 2005), et *in vivo*, par des tests cutanés chez des patients allergiques (Peeters et al., 2007 ; Bernard et al., 2007 ; Flinterman et al., 2007). La majorité des études fait ressortir le fort potentiel allergénique des albumines 2S en dépit de leur faible quantité dans la graine d'arachide. Les albumines 2S de l'arachide (Ara h 2, Ara h 6) sont des protéines résistantes à la digestion et aux traitements thermiques (Lehmann et al., 2006).

Les allergènes Ara h 5 (profiline) et Ara h 7 (albumine 2S) ont également été décrits comme des allergènes mineurs de l'arachide (Kleber-Janke et al., 1999). Ara h 8, la protéine homologue à Bet v 1, l'allergène majeur du pollen de bouleau, a été récemment clonée et est reconnue par 85% des patients qui sont sensibilisés au pollen de bouleau (Mittag et al., 2004). Ara h 9, la protéine de transfert lipidique (LTP) de l'arachide a également été caractérisée récemment comme étant un allergène de l'arachide (Lauer et al., 2008). Ara h 10 et Ara h 11, protéines de la famille des oléosines, ont également été décrites comme étant des allergènes mineurs (Pons et al., 2002).

3.4.3.3. Identification des allergènes alimentaires

L'identification des constituants allergéniques par immunodétection passe nécessairement par le système de reconnaissance du site anticorps spécifique de l'IgE humaine. Dès 1972, l'invention de plusieurs techniques immuno chimiques ont permis de détecter la plupart des constituants allergéniques potentiels présents dans un extrait. Il s'agit soit des techniques combinées d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle, soit des techniques de transfert des protéines et des glycoprotéines.

L'électrophorèse bidimensionnelle permet la séparation et la révélation des substances protéiques. D'autre part, les techniques d'immunoempreintes permettent de détecter les molécules allergisantes et décèlent les molécules dites isoallergènes de mêmes masses moléculaires mais de p.I différents en raison des différences mineures dans les séquences d'acides aminés (Besler, 2001). Des informations sur la séquence en acides aminés des peptides peuvent être obtenues grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Le premier spectromètre est utilisé pour séparer en fonction du rapport M/2 les oligopeptides

d'un hydrolysate de protéines. L'oligopeptide ionisé et sélectionné est dirigé vers un second spectromètre pour la fragmentation par collision avec des molécules d'hélium ou d'argon. Un grand nombre de séquences en acides aminés de protéines allergènes sont actuellement disponibles dans des banques de données Genbank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory), Uni-Prot et PDB (Protein Data Bank). Ces banques fournissent des réponses sur la fonction, les modifications post-traductionnelles, les domaines et les sites catalytiques (Brusic et al., 2003).

3.4.3.4. Utilisation des modèles animaux dans les études des allergènes

Ces dernières années, les recherches ont évalué les allergènes alimentaires principalement par le biais d'analyses bio-informatiques, des simulations de digestion gastrique, d'analyses sérologiques, des tests sur modèles cellulaires et des tests sur modèle animal. Ce dernier, malgré ses limites, reste la méthode la plus directe pour évaluer l'allergénicité potentielle des aliments (Huang et al., 2018).

Parmi les modèles murins d'allergie alimentaire, on peut distinguer (1) les modèles qui étudient uniquement les réponses immunitaires envers les allergènes appliqués, tels que l'induction de réponses Th2, la production d'IgE et d'IgG1, ou l'activation des mastocytes et (2) les modèles qui essaient également pour recréer les symptômes cliniques de la réaction allergique alimentaire tels que l'inflammation locale dans l'intestin, la bouche et le visage, les réactions anaphylactiques et les changements de comportement (ex. activité réduite).

Les modèles qui étudient uniquement les réponses immunitaires envers les allergènes sont principalement utilisés pour l'évaluation des risques liés aux protéines potentiellement allergènes, tandis que les modèles murins reflétant en outre la pathologie clinique associée à l'allergie alimentaire peuvent en théorie être utilisés pour mieux comprendre les mécanismes pathologiques sous-jacents et pour évaluer de nouvelles options de traitement (Hamilton & Oppenheimer, 2015). Les plus grandes variations parmi les modèles murins développés se trouvent dans la phase de sensibilisation. La voie d'application choisie, la dose, le nombre et la fréquence des applications, ainsi que le choix de l'adjuvant, peuvent influencer de manière critique le succès de la sensibilisation. Bien que chaque allergène se comporte différemment, en général, il a été démontré à plusieurs reprises que des quantités d'allergènes plus faibles ont un potentiel de sensibilisation plus élevé que des doses d'allergènes plus élevées correspondantes (Li et al., 2000).

En outre, d'autres facteurs peuvent influencer la réussite de la sensibilisation des animaux à savoir : le régime alimentaire, le microbiome, la qualité des allergènes utilisés ainsi que les

facteurs liés à l'hôte tels que la souche de souris choisie, le sexe et l'âge des animaux, ainsi que les différences génétiques entre les animaux qui peuvent également influencer le processus de sensibilisation (Bøgh et al., 2016).

Enfin, la lecture des réactions allergiques induites est divisée en paramètres cliniques et immunologiques : les paramètres cliniques comprennent, le développement et la gravité de l'anaphylaxie induite, les symptômes cliniques de l'inflammation gastro-intestinale, les changements dans l'activité animale, la mobilité et le comportement sont étudiés (Fig. 18). Les paramètres immunologiques comprennent généralement l'induction de la réponse Th2, la production d'anticorps IgG1 et IgE totaux ou spécifiques à l'allergène, leur activité biologique respective, l'activation des mastocytes induite, ainsi que les changements dans la fréquence, le phénotype ou l'activation d'autres types de cellules immunitaires (Schülke & Albrecht, 2019).

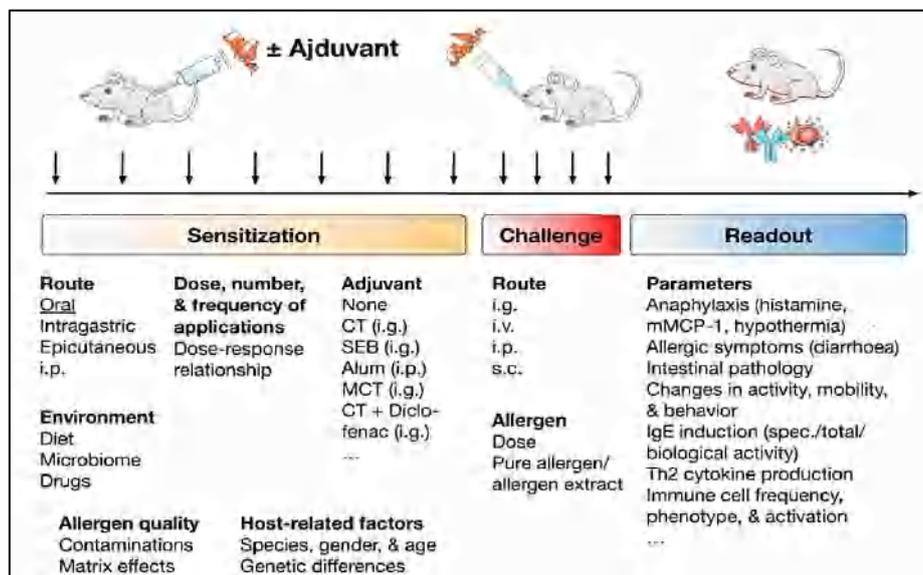


Figure 18. Configuration expérimentale, facteurs contribuant à la réussite de l'établissement et paramètres de lecture généralement étudiés dans les modèles publiés d'allergie alimentaire chez la souris (Schülke & Albrecht, 2019).

Malgré que la caractérisation d'un modèle d'allergie alimentaire à l'aide de la température, du taux d'Ig, du phénotypage de l'infiltrat cellulaire et de la production de cytokines donne un aperçu de la réaction tout en nous donnant un aperçu du degré de capacité sensibilisante de l'allergène utilisé. Néanmoins, même si les mesures *in vivo* et les expériences *ex vivo* nous apportent de nombreuses réponses sur la réponse immunitaire et la phase de sensibilisation, nous n'avons toujours pas une vision complète des mécanismes immunitaires à l'origine de chaque réaction. Il existe encore un fort besoin de mieux définir la réaction allergique pour prédire les résultats cliniques de la sensibilisation aux nouvelles protéines alimentaires. Bien

que les modèles actuellement disponibles soient adaptés à l'étude de la physiopathologie de l'allergie alimentaire, ils ne peuvent toujours pas prédire l'ampleur du potentiel allergique d'un allergène particulier. Découvrir et mettre en évidence les molécules et les cellules impliquées à la fois dans la sensibilisation et l'élicitation sont nécessaires pour améliorer les modèles d'évaluation des risques et faciliter l'introduction de nouvelles sources de protéines dans notre alimentation avec un faible risque de sensibilisation allergique.

3.4.3.6. Traitements d'actualité contre l'allergie à l'arachide

Au quotidien, l'allergie à l'arachide est une source de stress pour les personnes allergiques, qui doivent sans cesse surveiller la composition de ce qu'ils mangent. Alors qu'il n'en existe aucune solution pour le moment, un nouveau traitement de l'allergie à l'arachide pourrait bientôt protéger les personnes allergiques aux arachides d'une consommation accidentelle. Plusieurs chercheurs ont exploré la possibilité de trouver un remède pour l'allergie à l'arachide. Ainsi, de nombreuses solutions ont été proposées qu'ils soient sous forme de médicament ou bien sous forme de traitement. L'équipe DBV technologies a été parmi les premières équipes à présenter un produit pour les patients allergiques aux arachides sous forme de patch. Ce remède, a été présenté comme une solution radicale contre ce type d'allergie et avait eu récemment l'approbation de la FDA (The United States Food and Drug Administration). Une équipe de la société pharmaceutique Aimmune Therapeutics avait présenté une étude qui a été menée auprès de 551 participants de 4 à 55 ans, dont la majorité (496 personnes) avait entre 4 et 17 ans. Le traitement expérimental se présentait sous forme de gélules remplies d'une poudre à l'arachide, en guise d'immunothérapie orale. L'idée était de traiter l'allergie en exposant progressivement le corps à l'ingrédient pour lequel il est allergique, avec des doses de plus en plus grandes. Les résultats de cette étude à l'issue de l'expérience, environ deux tiers (67%) des enfants et des adolescents toléraient au moins 600 mg de protéines d'arachide, contre seulement 4% des participants sous placebo. Hormis quelques maux de ventre au début, la plupart des participants ont bien toléré ce traitement expérimental.

Dans le même sens, une étude du Murdoch Children's Research Institute en Australie publiée dans *The Lancet Child and Adolescent Health* propose un début de solution pour l'allergie à l'arachide. Pour cela les chercheurs ont étudié le cas de 48 enfants allergiques et leur ont fait suivre différents traitements. Pendant les essais cliniques qui ont débuté en 2013, la moitié des enfants a reçu un traitement appelé PPOIT contenant des probiotiques de souche *Lactobacillus rhamnosus* combinés à de la protéine d'arachide en dose croissante pendant dix-huit mois. L'autre moitié s'est vue administrer un placebo. Au bout de dix-huit mois, 82% des enfants

traités au PPOIT ont été reconnus tolérants à l'arachide contre 4% pour ceux qui ont reçu le placebo. Quatre ans plus tard, ils étaient 70% dans le premier groupe à avoir conservé cette tolérance. Les auteurs de l'étude parlent alors de tolérance acquise sur le long terme. Le plus important avec cette découverte est que des enfants allergiques à l'arachide ont pu manger des cacahuètes comme ceux qui n'ont aucune allergie.

Enfin, malgré la diversité des solutions proposées et les études accentuées sur l'immunothérapie, l'utilisation des variétés d'arachide hypoallergéniques reste le remède le plus efficace et le plus sûr pour les personnes allergiques du moment qu'on ne peut toujours pas mesurer les quantités exactes des cacahouètes qu'on peut avaler quand on mange, ni maîtriser la période d'assurance de la tolérance acquise (Feuille & Nowak-Wegrzyn, 2018).

Matériel et méthodes

1. Présentation du matériel végétal et des sites de collecte

1.1. Présentation des sites de collecte

L'étude a porté sur des accessions d'arachides (*Arachis hypogaea*) collectées dans plusieurs sites de culture répartis sur quatre wilayas d'Algérie à savoir : El Taref, El Oued, Ghardaïa et Adrar (Fig.1).

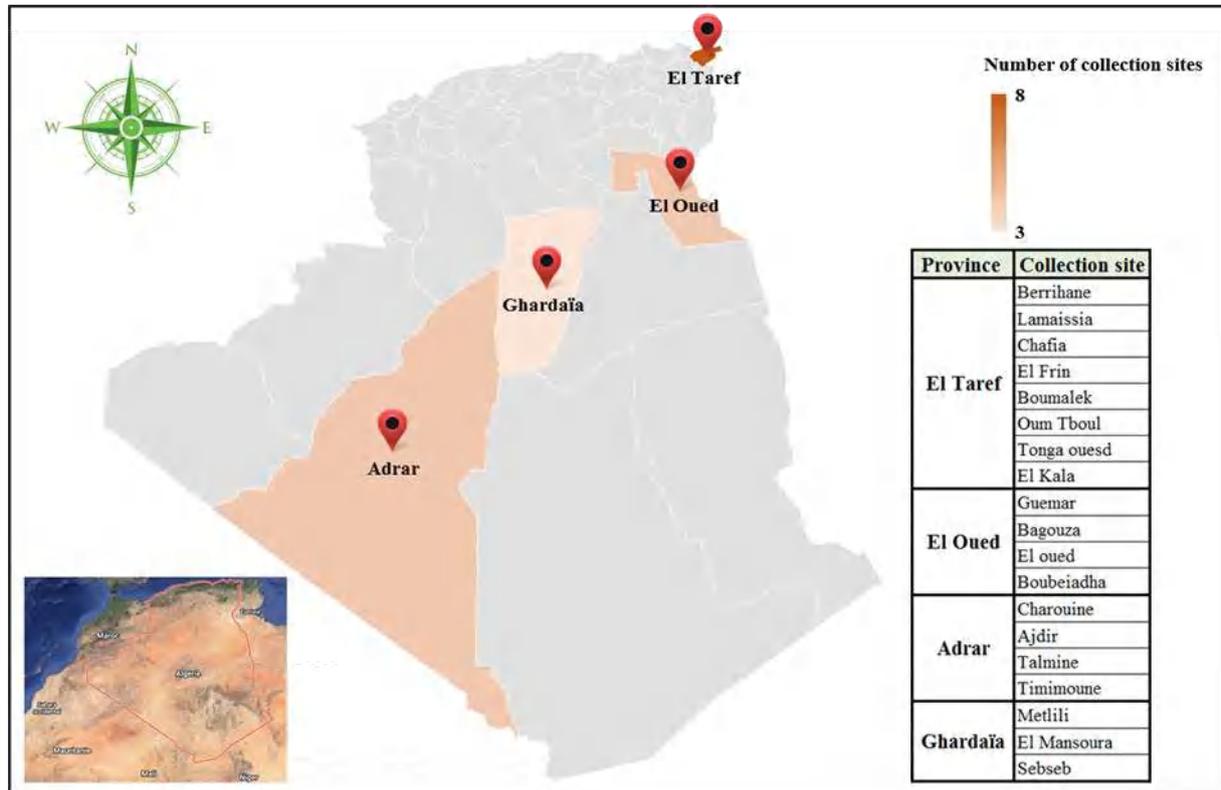


Figure 1. Carte des sites d'échantillonnage des accessions d'arachide étudiées.

1.2. Présentation du matériel végétal

Au total, 30 accessions ont été étudiées dont 14 accessions de la wilaya d'El Taref, 5 de la wilaya de Ghardaïa, 6 de la wilaya d'El Oued et 5 de la wilaya d'Adrar. Le nombre d'individus choisis par cultivars a varié entre 2 et 5, selon l'aspect morphologique de la plante, faisant un total de 90 accessions analysées (Tab.1).

Tableau 1. Accessions d'arachide collectées et leurs origines.

Cultivars	Région de la collecte	Zone géographique	Caractéristique climatique	Wilaya
Berrihane 1	Berrihane, El Kala	Côtière	Subhumide	Taref
Berrihane 2				
Lamaissia 1	Lamaissia, El Kala			
Lamaissia 2				
Chefia 1	El Kala			
Chefia 2				
Kala 1				
Kala 2				
Kala 3				
Kala 4				
El Frin				
Boumalek				
Oum Tboul	Oum Tboul, El Kala			
Tonga-ouest	Tonga-Ouest, El Kala			
Sebseb 1	Sebseb	Nord de la Sahara	Saharien	Ghardaïa
Sebseb 2				
Sebseb 3				
El Mansoura	El Mansoura			
Metlili	Metlili			
Boubeiadha 1	Boubeiadha, Taghzout			
Boubeiadha 2				
El oued 1	Guemar			
El oued 2	Taghzout (Bagouza)			
El oued 3	El oued			
El oued 4				
Hiba 1	Charouine	Centre de la Sahara		Adrar
Hiba 2				
Adrar 1	Tmimoune (Ajdir)			
Adrar 2	Timimoune (Talmine)			
Timimoune	Timimoune			

Les graines collectées ont fait d'abord l'objet d'une culture sous une serre au niveau du centre de recherche en biotechnologie de Constantine (CRBt). Pendant la durée de culture (9 mois) les plantes ont été irriguées selon le besoin jusqu'à la récolte (Fig.2).



Figure 2. Culture des accessions d'arachide dans la serre.

Partie I : Analyse de la diversité génétique

1. Caractérisation morphologique des plantes d'arachide

Traditionnellement, la diversité dans et entre les populations était déterminée en évaluant des différences morphologiques (Idi Garba et al., 2015 ; Kushwah et al., 2016). Ces mesures ont l'avantage d'être facilement accessibles en utilisant des équipements simples. Dans le présent travail quarante caractères (morphométrique et agronomique) ont été étudiés, l'investigation a ciblé 25 descripteurs morphologiques et 15 descripteurs agronomiques sélectionnés à partir du manuel IBPGR / ICRISAT sur l'arachide (1992). Ainsi, les observations ont porté sur un nombre de 2 à 5 individus par accession.

Les caractères morphométriques décrivant la tige, les feuilles, les racines, les fleurs, les gousses et les graines ont été analysés en utilisant une loupe et un pied à coulisse. Les caractères de la feuille et de la tige ont été déterminés au niveau du premier nœud productif et les caractères des gousses et des graines ont été observés sur des gousses matures.

Chacun des caractères morphologiques étudiés été soumis à une échelle d'évaluation allant de 2 jusqu'à 15 états selon les observations enregistrées.

1.1. Descripteurs quantitatifs (agronomiques)

En plus de leurs importances agronomiques, les caractères quantitatifs jouent un rôle crucial dans les études de la diversité génétique. Dans cette prospection, 15 caractères quantitatifs ont été évalués et les résultats obtenus sont présentés sous forme des moyennes \pm les écarts types. Enfin, les descripteurs ont été regroupés selon la partie étudiée de la plante comme suit :

- 1. La tige (3 caractères)** : La hauteur de la tige principale en cm, largeur ou étalement de la plante en cm, et le nombre de jours jusqu'à la maturité de la plante.
- 2. Les fleurs (1 caractère)** : Nombre de jours à la floraison, évaluer depuis la levée jusqu'au stade où 50% des plantes sont en floraison.
- 3. Les feuilles (4 caractères)** : Longueur de la foliole en mm, Largeur de la foliole en mm, Surface de la feuille en cm², et le contenu en chlorophylle en unité SPAD.
- 4. Les gousses (3 caractères)** : Longueur de la gousse en mm, Largeur de la gousse en mm, et le poids de 10 gousses en g.
- 5. Les graines (4 caractères)** : Longueurs de la graine en mm, Largeur de la graine en mm, % de la matière grasse, et le poids de 100 graines en g.

1.1.1. Mesure du contenu en chlorophylle

Cette mesure a été effectuée en utilisant un Chlorophyll Meter (SPAD 502 plus) à pince. Cet appareil mesure la teneur en chlorophylle en analysant le rapport des transmittances dans le rouge et le proche infrarouge où l'estimation de la teneur en chlorophylle est réalisée à partir d'une relation empirique entre la transmittance et la concentration en chlorophylle. La précision des estimations est toutefois limitée par l'influence de la structure de la feuille sur la transmission (Hardacre et al, 1984 ; Yadava, 1986).

L'appareil a été utilisé pour effectuer 5 mesures différentes sur des feuilles choisies au hasard sur la plante, les valeurs affichées sont comprises entre 0,0 et 99,9 unités SPAD (SPAD pour **S**oil and **P**lant **A**nalyze **D**evelopments) et sont corrélées avec la teneur en chlorophylle de la feuille. Enfin, les résultats obtenus sont présentés sous forme de moyenne des répétitions \pm l'écart type.

1.1.2. Mesure de la teneur en matière grasse

La teneur en matière grasse des différentes accessions a été évaluée en utilisant le soxhlet (FOSS, SoxtecTM 8000). Ainsi, pour chaque gramme de la poudre d'arachide placé dans la cartouche de l'appareil 25 ml d'hexane sont versé dans le godet correspondant. La teneur de la matière grasse est évaluée en calculant la différence entre le poids du godet vide pris avant extraction et le poids du godet contenant la matière grasse après extraction. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage \pm l'écart type.

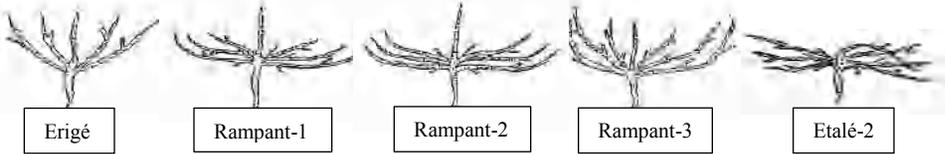
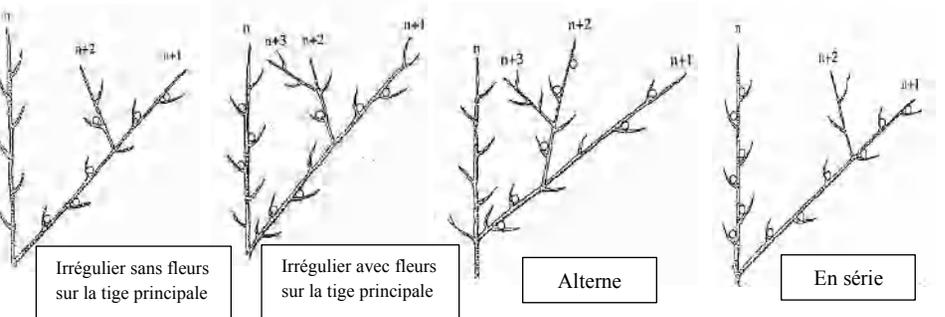
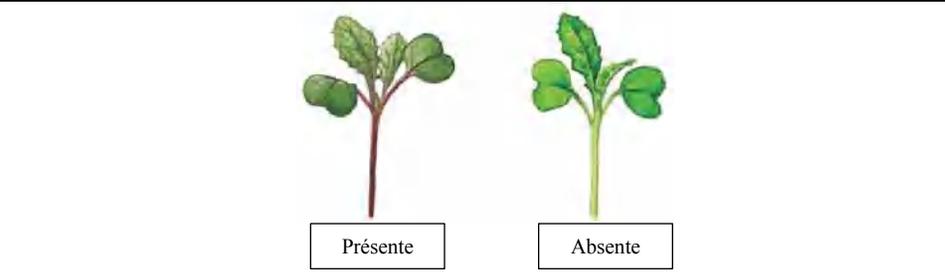
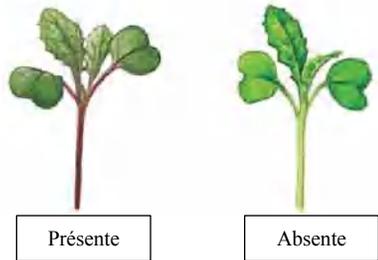
1.2. Descripteurs qualitatifs (morphologiques)

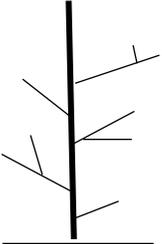
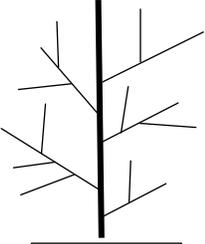
Concernant les caractères qualitatifs, la méthodologie de travail s'est basée sur une appréciation visuelle des couleurs (selon les codes de la couleur RHS) et des formes suivant

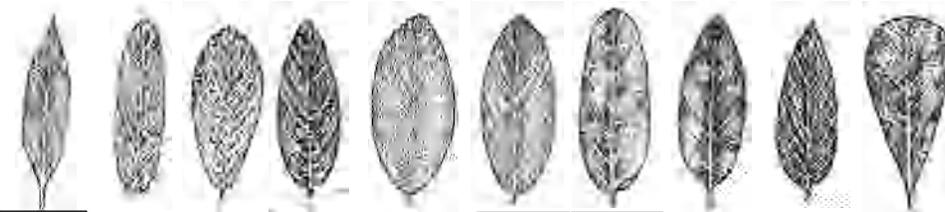
une codification des caractères exprimés selon la codification du descripteur IBPGR / ICRISAT de l'arachide (1992).

Le tableau 2 résume les caractères étudiés ainsi que les états et les codes utilisés.

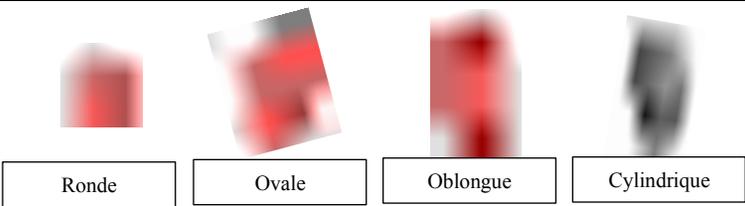
Tableau 2. Liste des caractères qualitatifs, des Etats et des codes utilisés.

Partie de la plante	Caractères	Codification / Etat	Représentation schématique du caractère
Tige	Port de la plante	0- Erigé, 1- Rampant-1, 2- Rampant-2, 3- Rampant-3, 4- Etalé-2	
	Mode d'embranchement	0- Irrégulier sans fleurs sur la tige principale, 1- Irrégulier avec des fleurs sur la tige principale, 2- Alterné, 3- En série	
	Nombre de branches	0- Secondaire, 1- Tertiaire	
	Pigmentation de la tige	0- Absente, 1- Présente	
	Pilosité de la tige	0- Glabre, 1- Légèrement couverte de poils, poils rangés sur une ou deux lignes le long de la tige principale, 2- Moyennement poilue, trois-quatre lignes le long de l'axe	

		principal, 3- Très poilue, la majorité de la surface est couverte de poils, 4- Laineuse	
	Densité des branches	0- Modérée, 1- Elevée	  <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Modéré</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Elevé</div> </div>
Fleurs	Type d'inflorescence	0- Simple, 1- Composé	
	Pigmentation du gynophore	0- Absente, 1- Présente	
	Couleur des marqueurs du pétale de l'étendard	0- Jaune 9B 1- Orange 24A	  <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Jaune 9B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Orange 24A</div> </div>
	Distribution des fleurs	0- Alterne 1- Complexe 2- Continue	   <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Alterne</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Continue</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; text-align: center;">Complexe</div> </div>

Feuilles	Forme de la Foliole	0- Oblongue-lancéolée, 1- Oblongue, 2- Obovale, 3- Ovale 4- Suborbiculaire, 5- Large-elliptique, 6- Etroite-elliptique 7- Oblongue-elliptique 8- Elliptique 9- Cunéiforme	 
	Pilosité de la foliole	0- Presque glabre sur les deux surfaces, 1- Presque glabre en dessus, poilue en dessous, 2- Presque glabre en dessus, poilue et/ou couverte de soie en dessous	
	Marge de la foliole	0- Entière, 1- Poilue	
	Sommet de la foliole	0- Obtus, 1- Aigu	  
	Couleur de la feuille	0- Vert 129 1- Vert 134 A 2- Vert 135 3- Vert 140 B 4- Vert 142 5- Jaune-vert 144 C 6- Jaune-vert 149	
Racine	Capacité de nodulation	0- Sans nodules, 1- Avec nodules	  

Gousse	Etranglement de la gousse	0- Sans étranglement, 1- Léger, 2- Modéré, 3- Profond, 4- Très profond	    
			<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Sans étranglement</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Léger</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Modéré</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Profond</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Très profond</div> </div>
	Réticulation de la gousse	0- Sans réticulation, 1- Légère, 2- Modérée, 3- Proéminente, 4- Très proéminente	    
			<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Sans réticulation</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Légère</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Modérée</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Proéminente</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Sans proéminente</div> </div>
	Bec de la gousse	0- Sans bec, 1- Mince, 2- Modéré, 3- Prononcé, 4- Très prononcé	    
			<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Sans bec</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Mince</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Modéré</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Prononcé</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Très prononcé</div> </div>
	Texture de la gousse	0- Fine 1- Moyenne 2- Grossière	  
			<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Fine</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Moyenne</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Grossière</div> </div>
Graine	Nombre de graine par gousse	0- 2-1 1- 2-3-1/2-1-3 2- 3-2-1/3-1-2	
	Aspect du tégument	0- Une seule couleur, 1- Graine bigarrée	 
			<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Une seule couleur</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Graine bigarrée</div> </div>

Forme de la graine	0- Ronde 1- Ovale 2- Oblongue 3- Cylindrique	 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">Ronde</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">Ovale</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">Oblongue</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px 10px;">Cylindrique</div> </div>
Couleur du tégument de la graine	0-Orange-jaune 6 1-Orange-jaune 19 2- Orange 26 3- Orange 28 4- Orange 29 5- Rouge-orange 31 6- Rouge-orange 33 7- Rouge-orange 34 8- Rouge-orange 35 9- Rose-rouge 37 10- Gris-orange 165 11- Gris-orange 172 12- Gris-orange 175 13- Gris-orange 177 14- Gris-orange 178	
Couleur de la graine	0- Jaune 1 1- Jaune 4 2- Jaune 5 3- Jaune 8 4- Jaune 10 5- Jaune 13	

2. Caractérisation Biochimique

Les marqueurs protéiques (généralement appelés marqueurs biochimiques) sont des marqueurs qui étudient les protéines de réserve en utilisant l'avantage des propriétés de migration de ces dernières sous un champ électrique. Ainsi, l'électrophorèse représente une technique clé pour l'étude des polymorphismes d'une ou plusieurs protéines. Cependant, les marqueurs protéiques peuvent être limités par une influence environnementale et des modifications au cours des différents stades de développement (Kremer, 2000). Malgré cela, les protéines de réserve constituent un complément robuste à l'analyse morphométrique des individus.

2.1. Extraction des protéines de réserve

L'extraction des protéines de réserve a été effectuée selon le protocole décrit par Singh et al., 1991 avec quelques modifications. Après avoir retiré la membrane externe, les graines d'arachide ont été finement broyées et dégraissées à l'hexane pendant une nuit sous une douce agitation (10 ml/g de poids sec). La poudre a été par la suite filtrée puis séchée à l'aire libre. Après séchage, 100 µl de la solution d'extraction fraîchement préparée (Annexe 1) ont été rajouté à 100 mg de la poudre d'arachide sèche, le mélange a été incubé pendant 1 heure sous agitation à température ambiante puis centrifugé 1 min à 10000 g. Le surnageant a été enfin récupéré dans un tube propre et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des protéines de réserve extraites par électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide vertical à concentration de 12% (Annexe 2) dans les conditions dénaturantes selon la méthode décrite par Laemmli (1970). La migration a été effectuée sous un courant constant de 40 mA pendant 120 minutes. Après la fin de la migration, les gels ont été démoulés puis incubés sous agitation dans une solution de coloration (Annexe 2) pendant une nuit. Afin de visualiser les bandes des protéines, l'excès de coloration dans le gel a été éliminé en utilisant une solution de décoloration (Annexe 2). Enfin les gels ont été scannés en utilisant un système d'imagerie (Gel Doc XR+, Biorad), puis analysé par le logiciel Image Lab version 5.1 (Biorad) afin d'estimer l'intensité des bandes et d'identifier le poids moléculaire en se référant à un marqueur de taille (Protein ladder, Fisher Bioreagents).

3. Caractérisation moléculaire

Les marqueurs moléculaires concernent la molécule d'ADN, ils sont considérés comme des mesures objectives de la variation vue qu'ils ne sont pas soumis aux influences de l'environnement, ni au stade de développement de la plante (Tagu & Moussard, 2006).

3.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN total a été effectuée à partir de petites folioles fraîches des 30 cultivars d'arachide selon la méthode de CTAB (Annexe 3) décrite par Doyle & Dyle (1990). En bref, trois étapes principales ont été exécutées : une extraction de l'ADN avec le tampon CTAB 2%, une élimination des protéines par le phénol et isolement des molécules de l'ADN, une précipitation de l'ADN avec de l'isopropanol. Enfin, plusieurs étapes de lavage et de purification ont été effectuées dans le but d'éliminer les inhibiteurs de la PCR et d'améliorer la qualité de l'ADN extrait. La pelote de l'ADN ainsi obtenue est solubilisée dans le tampon TE 0.1X et traitée avec de l'RNase. La concentration et la qualité de l'ADN extrait ont été évaluées par le spectrophotomètre Nanodrop 8000 (Thermo fisher), et sur un gel d'agarose à 0,8 %.

3.2. Vérification de la qualité et de la quantité des ADN extraits

La qualité et la quantité des ADN extraits ont été analysées dans un premier temps par électrophorèse sur un gel d'agarose (Annexe 4). Tout d'abord, un gel d'agarose à 0,8% a été préparé sur lequel 5 µl de chaque échantillon d'ADN mélangé avec 1µl du tampon de charge ont été déposés dans les puits. La migration a été effectuée dans un tampon TBEX1 sous une tension de 80V, et les gels ont été visualisés sous une lumière UV.

Les extraits d'ADN ont été également analysés par le spectrophotomètre Nanodrop 8000 afin d'estimer la concentration et d'évaluer les contaminations en sel et en ARN.

3.3. Choix des marqueurs SSR

Plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude de la diversité génétique de l'arachide et l'identification des cultivars ayant des caractéristiques agronomiques importantes comme le rendement et le contenu en matière grasse (Knauft & Gorbet, 1989 ; de Carvalho Moretzsohn et al., 2004 ; Al-Saghir & Abdel-Salam, 2015). Parmi les marqueurs moléculaires étudiés, on trouve les RAPD (Halward et al., 1991; Subramanian et al., 2000), l'AFLP (Gimenes et al., 2002; Herselman, 2003), les ISSR (Raina et al., 2001) et les SSR (Halward et al., 1991; Paik-Ro et al., 1992; Kochert et al., 1996; He et al., 2005), les marqueurs microsatellites (SSR) étaient les plus discriminants et les mieux adaptés pour apprécier la diversité des cultivars de l'arachide

(Hopkins & Casa, 1999; Ferguson et al., 2004; Mace et al., 2006). Dans le présent travail 11 loci ont été sélectionnés suivant leur polymorphisme et reproductibilité afin d'apprécier la diversité génétique dans une collection de 68 cultivars sélectionnés sur la base de leur origine géographique et aspect morphologique. Le tableau 3 résume les propriétés des amorces étudiées.

Tableau 3. Liste des SSRs utilisés et leurs caractéristiques.

N°	Marqueur	Séquence forward 5'-3'	Ta °C	Référence
1	Lec-1	CAAGCATCAACAACAACGA	57	Hopkins et al., 1999
2	TC3H07	CAATGGGAGGCAAATCAAGT	60	Hopkins et al., 1999
3	S-90	GAGAGCGAAAGAGAACGAGAC	57	Wang et al., 2007
4	GA35	CAAAGTTTGCAGTGATTTTGTG	60	Li et al., 2011
5	Ah4-26	TGGAATCTATTGCTCATCGGCTCTG	65	Hopkins et al., 1999
6	PM3	GAAAGAAATTATACTCAATTATGC	57	He et al., 2003
7	S-31	GGCGGCGATGTAGAACCCTCCAGTAG	60	Wang et al., 2007
8	Seq13E9	GGAGGAGGACGACGATGATA	60	Ferguson et al., 2005
9	TC11A04	ACTCTGCATGGATGGCTACAG	60	Moretzsohn et al., 2005
10	Ah3	TCGGAGAACAAGCACACATC	60	Gimenes et al., 2007
11	TC1E01	CAGCAAAGAGTCGTCAGTCG	60	Moretzsohn et al., 2005

3.4. Réaction d'amplification en chaîne (PCR)

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume de 25 µl contenant 1 x tampon Go Taq, 2 mM de MgCl₂, 0,2 µM de chaque amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,04 U d'ADN polymérase Go Taq (Promega, Madison, USA) et 2 µl de l'ADN extrait. Enfin, le volume a été complété à 25 µl avec de l'eau ultra-pure stérile. L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Biorad C1000 en utilisant le profil thermique suivant : 95°C pendant 5 min avec 35 cycles de 95°C pendant 60s, 57°C - 65°C (selon la température d'alignement des amorces) pendant 60s, 72°C pendant 60s, et une extension finale à 72°C pendant 5 min. La réussite de la réaction PCR a été vérifiée sur un gel d'agarose à 1,2 % avant l'identification des tailles des amplicons sur électrophorèse capillaire et électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturante (PAGE).

3.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

La technique PAGE est une technique qui permet de séparer des fragments d'ADN ayant au moins une différence de deux paires de bases, cette technique a été utilisée pour analyser les marqueurs microsatellites comme rapporté par Morgante et Olivieri (1993).

Dans le présent travail, un gel de polyacrylamide de 6% a été préparé à partir d'une solution à 40% d'acrylamide-N,N'-méthylène bisacrylamide (19:1), du TBE X10, de l'APS et du TEMED (Annexe 5). Le gel est ensuite coulé horizontalement sur des plaques prétraitées avec du Bind silane et du Repel Silane (Annexe 5) permettant l'adhérence du gel sur la face de la plaque pleine et sa répulsion par la face de la plaque encoche, respectivement. Après l'insertion des peignes, les plaques de verre avec la solution du gel ont été maintenues à température ambiante pendant une nuit pour permettre la polymérisation du gel.

Après polymérisation du gel, 10 µl des produits PCR ont été séparés sur le gel dans un tampon TBE X1 pendant 2h à 300V. Les amplicons séparés ont été visualisés par une coloration de nitrate d'argent selon les étapes décrite par Benbouza et al., (2006) (Annexe 5). Les gels ont été scannés par le système d'imagerie Gel Doc XR+, Biorad, puis analysés par le logiciel Image Lab version 5.1 (Biorad) afin d'identifier les tailles des amplicons par référence au marqueur de taille pUC19 (Sau3A I Digest Invitrogen, USA).

3.4.2. Électrophorèse capillaire sur séquenceur ABI 35000XL genetic analyzer

L'électrophorèse capillaire a été utilisée pour analyser les allèles ayant une différence d'une paire de base en utilisant des amorces précédemment marquées avec des fluorochromes sur leurs extrémités 5'. Dans une microplaque de PCR, 1 µl de chaque produit de PCR et du standard (standard GeneScan 600 LIZ, Applied Biosystems) ont été mélangés avec 1 µl de formamide, le mélange a été dénaturé à 95°C pendant 5 min puis analysé par électrophorèse capillaire sur un séquenceur ABI 35000XL Genetic Analyzer Applied Biosystems. Enfin, les pics enregistrés ont été traités par le logiciel GeneMapper v5 (Applied Biosystems) afin d'identifier la taille des allèles. Chaque réaction PCR et électrophorèse capillaire ont été répétées au moins deux fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

4. Analyses des données morphologiques, biochimiques et moléculaires

4.1. Données morphologiques

4.1.1. Analyse des données quantitatives

Les données quantitatives ont fait d'abord l'objet d'une analyse descriptive et des tests ANOVA. Après avoir déterminé les moyennes, les écarts types et les coefficients de variation, la matrice de corrélation a été construite afin d'identifier la relation entre les caractères. L'homogénéité des variances a été également vérifiée en utilisant le test de Breusch pagan avant de lancer une analyse ANOVA à partir du tableau des fréquences en utilisant le test de Tukey ($p < 0,05$) en utilisant le logiciel XLSTAT (Version 2016.02.28451).

4.1.2. Analyse des données qualitatives

Les caractères qualitatifs ont été tout d'abord codifiés en utilisant des valeurs modèles suivant les états observés pour chaque caractère dans le but d'obtenir une estimation descriptive. Afin d'approfondir la description statistique une table des fréquences a été établie et étant donné que le degré de relation existant entre les caractères et les individus ne peut être établi avec la simple observation des fréquences obtenues dans la table, une étude de l'impact de chaque caractère sur la classification des individus a été effectuée.

La structure de la diversité morphologique a été enfin décrite à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP) pour expliquer l'importance des caractères étudiés (qu'ils soient quantitatifs ou qualitatifs) responsables de la variation parmi les génotypes d'arachide. La classification ascendante hiérarchique (CAH) a été également étudiée pour explorer la relation entre les accessions d'arachide en utilisant la méthode des groupes de paires non pondérées avec moyenne arithmétique (UPGMA). Toutes les analyses décrites précédemment ont été réalisées à l'aide du logiciel d'analyse de données XLSTAT (Version 2016.02.28451).

4.2. Analyse des données biochimiques

Concernant l'analyse des données des protéines de réserve, les profils électrophorétiques ont été analysés à l'aide du logiciel Image Lab version 5.1 (Biorad). La présence/absence d'une bande a été notée comme 1/0, respectivement, la matrice binaire a été utilisée pour calculer les distances génétiques par paire. Enfin, le dendrogramme décrivant les distances génétiques entre les accessions méthode UPGMA a été tracé.

4.3. Analyse des données moléculaires

A partir des données moléculaires obtenues, plusieurs analyses ont été effectuées afin d'évaluer la diversité génétique et le degré informatif des SSR utilisés. Tout d'abord, les paramètres génétiques ont été calculés sur la base des résultats d'amplification obtenus sur les 68 individus avec les 11 microsatellites amplifiés. La diversité génétique intra-population et inter-population a été également estimée à l'aide de calcul de plusieurs indices génétiques (Tableau 4). Compte tenu de la nature tétraploïde de l'arachide, le logiciel Polysat (Clark et Drauch Schreier, 2017) a été utilisé pour transformer les données génotypiques en fichiers GenoDive (Meirmans, 2020) et STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Toutefois, la population étudiée a été subdivisée en quatre sous populations suivant l'origine des individus.

4.3.1. Etude de la diversité génétique

Plusieurs indices génétiques ont été calculés à savoir :

1. **Le nombre d'allèle par locus (N)** : comme son nom l'indique ce paramètre représente le nombre d'allèle recensé par locus.
2. **Fréquence allélique par population** : qui représente le taux de présence d'un allèle au sein d'une population.
3. **Les allèles rares** : ce paramètre représente le nombre d'allèles ayant une fréquence inférieure ou égale à 0,05
4. **Les allèles uniques** : ce paramètre représente le nombre d'allèles ayant une fréquence inférieure ou égale à 0,01
5. **Hétérozygotie** : sous l'hypothèse de Hardy-Weinberg, l'hétérozygotie attendue (H_e) et observée (H_o) ont été calculées où H_e représente la probabilité qu'un individu soit hétérozygote pour un locus donné et est calculée à partir des fréquences alléliques déterminées pour chaque locus à l'aide de la formule : $H_e = 1 - \sum p_i^2$, tel que p_i est la fréquence de l'allèle i . H_o représente la proportion d'individus hétérozygotes au locus i selon la formule suivante : $H_o = 1/l \sum p_i$, où p_i est le nombre d'hétérozygotes observés pour le locus i , et l représente le nombre totale des génotypes analysés pour ce même locus (Nei, 1987).
6. **Indice de fixation ($G'st$)** : il exprime la probabilité qu'un allèle soit hétérozygote pour un individu de la population dans un même locus, ce paramètre est calculé à l'écart de l'équilibre de Hardy Weinberg et sa valeur varie entre 0 et 1 (Wright, 1965).
7. **Le 'Polymorphic information content (PIC)** : cet indice a été introduit pour la première fois par Botstein (1980). Il permet de donner une appréciation sur l'information que peut donner un marqueur sur l'hétérozygotie. Plus le marqueur est polymorphe, plus la fréquence des hétérozygotes à ce locus est élevée et par conséquent plus ce marqueur sera utile pour les analyses de parenté et de sélection génétique. Plus simplement, c'est la probabilité qu'un individu soit hétérozygote à un locus. Il est calculé par la formule suivante :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

4.3.2. Distance génétique entre les accessions et arbre phylogénétique

Afin d'évaluer les relations génétiques entre les individus de la population étudiée, les différents allèles identifiés ont été représentés dans une matrice binaire 1/0 où 1 signifie la présence de l'allèle et 0 signifie son absence. La proportion des fragments amplifiés similaires a été utilisée pour obtenir une matrice de similarité basée sur le coefficient SM (Simple Match) cette dernière a servi pour tracer le dendrogramme par la méthode (Nei and Li, 1979) à l'aide du logiciel NTSYS-pc 2.11 (Exeter Software, Setauket, NY). Le coefficient de la corrélation cophenétique a été estimé en comparant avec le test de Mantel la matrice cophenétique obtenue à partir du dendrogramme avec la matrice de similarité originale. Les valeurs du bootstrap ont été obtenues à partir de 1000 répétitions en utilisant le logiciel TREECON1.3b (Van De Peer et De Wachter, 1994).

Les relations multivariées entre les 68 accessions d'arachide étudiées ont été évaluées par l'analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel NTSYS-pc 2.11. Les accessions ont été projetées le long des trois premiers axes principaux pour visualiser les affinités génétiques.

4.3.3. Structuration de la diversité génétique

Le but de cette analyse est de vérifier la subdivision de la population étudiée au niveau hiérarchique, autrement dit en deux ou plusieurs sous populations se regroupant par des profils génétiques semblables.

La structure génétique de la population a été analysée sur la base du regroupement bayésien à l'aide du logiciel STRUCTURE 2.3.4. Le modèle de STRUCTURE suppose l'existence de K populations (non prédéfinies), et chacune d'entre elles est caractérisée à chaque locus par un ensemble de fréquences alléliques. L'objectif de STRUCTURE est d'estimer conjointement les fréquences alléliques au sein des différentes populations et les coefficients d'appartenance ou de métissage des individus pour chaque population. Pour les valeurs de cluster de $K = 1$ à $K = 10$, un modèle « admixture » et un modèle de « fréquence d'allèle corrélé » ont été utilisés pour exécuter un algorithme de simulation de Monte Carlo à chaîne de Markov (MCMC). STRUCTURE cherche donc à créer des populations afin de minimiser l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg au sein de chacune d'elles.

Pour chaque valeur de K, le calcul a été répété 10 fois, chaque exécution a été appliquée avec un 'burn-in period' de 10,000 suivis par 100,000 'Monte Carlo Markov Chain' répétitions

pour estimer la proportion des pools génétiques pour chaque individu (Q). L'algorithme d'Evanno (Evanno et al., 2005) a été calculé pour déterminer le nombre optimal de valeur K à l'aide du logiciel STRUCTURE Harvester (Earl, 2012). Les accessions avec des proportions de membres (valeur Q) > 70 % ont été considérées comme pures et faisant partie de leur groupe correspondant, tandis que les accessions avec des proportions de membres inférieures à 70 % ont été considérées comme des mélanges. Pour minimiser la variance entre toutes les répliques de la valeur K sélectionnée, le programme CLUMPP version 1.1 (Jakobsson et Rosenberg, 2007) a été utilisé pour générer un seul fichier de matrice Q visualisé avec une interface en ligne appelée STRUCTURE PLOT (Ramasamy et al., 2014).

Enfin, l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA pour Analysis of MOlecular VAriance) a été réalisée en utilisant le logiciel Genodive entre et à l'intérieur des groupes générés par STRUCTURE afin de confirmer l'existence d'une structuration hiérarchique en calculant les G-statistiques : G_{is} et G_{st} tel que :

G_{st} : représente la variabilité entre les sous populations par rapport à la population totale, Il traduit le déficit en hétérozygotes dû à la subdivision de la population en sous populations et mesure le niveau de différenciation génétique entre les sous populations. Ce déficit en hétérozygotes est souvent attribué au dérivé génétique et/ou à un flux de gènes limités. Donc, il mesure la réduction relative des hétérozygotes, liée aux différences alléliques entre sous populations. C'est un indice de diversification des populations. Sa valeur varie entre 0 (pas de différence) et 1 (complètement différent, pas d'allèles communs). Lorsqu'il n'y a pas de différences de fréquence allélique entre les sous populations G_{st} prend alors la valeur de 0. Cependant, si l'indice G_{st} est égal à 1, cela signifie qu'aucun allèle n'est partagé entre les sous populations.

$$G_{st} = \frac{H_t - H_e}{H_t}$$

G_{is} : représente l'indice de consanguinité qui représente la variabilité des individus relatifs aux sous populations et mesure la réduction de l'hétérozygotie due à des croisements non aléatoires au sein des sous populations. Il varie entre -1 et 1 et est calculé comme suit :

$$G_{is} = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Partie II : Recherche et caractérisation des allergènes de l'arachide

1. Création de modèle de souris allergiques aux arachides

1.1. Choix de l'animal

1.1.1. Souche de l'animal

Les animaux utilisés dans le présent travail sont des souris de souche Balb/c. La grande homologie du système immunitaire de ces animaux avec celle de l'homme, leur permet d'imiter la réponse de ce dernier lors d'une provocation par des allergènes alimentaires et de produire une grande quantité d'anticorps spécifique de classe IgE (Zhou et al., 2016).

1.1.2. L'âge de l'animal

Hansen et al., 2011 ont étudié l'interaction entre l'âge, le sexe et la dose des allergènes à administrer en utilisant un modèle animal de souris balb/c, les résultats obtenus ont révélé que les souris âgées de 6 semaines présentent une réponse immunitaire qui se caractérise par une production maximale des anticorps de type IgE et IgG1.

1.1.3. Sexe de l'animal

Dans notre étude des souris de sexe femelle ont été utilisées. Ces dernières, (contrairement aux souris de sexe mâle) sont capables de produire des anticorps spécifiques (majoritairement de type IgE) contre les protéines de l'arachide étudiées (Orgel & Kulis, 2018).

1.2. Choix des variétés

Suivant les résultats de la diversité génétique obtenus dans la première partie du travail, six variétés génétiquement distantes ont été choisies pour effectuer l'étude *in vivo* (Tab.4). Le choix a porté sur des variétés appartenant au deux sous espèces étudiées et ayant différente origine géographique.

Tableau 4. Nom et origine des variétés utilisées pour l'étude *In vivo*.

Variété utilisé pour l'immunisation	Origine géographique	Groupe de souris correspondant	Nombre de souris / lot
Berrihane 01	Taref	G1	10
Lamaissia 01		G2	10
Sebseb 01		G3	10
El Oued 01	Ghardaïa	G4	10
El Frin	El Oued	G5	10
Timimoune	Adrar	G6	10
/	/	Contrôle	10

Soixante-dix souris ont été utilisées dans cette expérience. En plus du lot témoin, un lot de 10 souris a été utilisé pour chacune des variétés étudiées. L'expérience est réalisée avec l'approbation du Comité d'éthique local du centre de recherche en biotechnologie (CRBt). Les animaux ont été hébergés à l'animalerie du CRBt sur un cycle lumière/obscurité de 12 h et une température de $22 \pm 03^{\circ}\text{C}$, dans des cages en polystyrène sur litière de copeaux de bois. Les cages étaient nettoyées chaque 2 jours et la nourriture et l'eau ont été fournies selon les besoins. Le protocole d'induction de l'allergie à l'arachide est mis en route après 15 jours d'acclimatation des souris.

1.3. Extraction des protéines totales

L'extrait de protéine d'arachide a été préparé suivant la méthode de Duarte et al., 2011 avec quelques modifications. En bref, les protéines de l'arachide ont été extraites dans 50 ml de tampon phosphate 20 mM (pH 7,4) à partir de 10 g de farine d'arachide dégraissée avec de l'hexane. Le mélange a été centrifugé pendant 30 min à 3000g et 4°C . Après centrifugation, le surnageant récupéré a été centrifugé pour une deuxième fois à une vitesse de 10 000g pendant 30 min à 4°C . Le surnageant final a été lyophilisé et conservé à 4°C . Afin de vérifier l'efficacité du protocole de d'extraction et vérifier la présence des allergènes principaux, les extraits protéiques ont été analysés en utilisant la méthode de Bradford et le gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturante (SDS PAGE) selon la méthode de Laemmli (1970).

1.3.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Afin de mesurer la concentration des protéines dans les extraits lyophilisés, 20 μl de de la solution protéique (1mg/ml) et des dilutions de la gamme de BSA (Annexe 6) ont été mélangés avec 180 μl de la solution de Bradford (Bradford Reagent, SIGMA) dans une microplaque à 96 puits. Le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 20 min avant d'effectuer une mesure de l'absorbance à 595 nm sur un lecteur de microplaque (EnSpir, Multimode Plate Reader). Chaque mesure a été effectuée en trois répétitions et les résultats ont été présentés sous forme de la moyenne \pm l'écart type.

1.4. Choix de l'adjuvant

L'hydroxyde d'aluminium est l'un des adjuvants les plus utilisés dans le domaine de la vaccination, son mécanisme d'action repose sur son effet de dépôt au site d'injection ce qui conduit à un relargage progressif de l'antigène (80 % des antigènes protéiques sont relâchés dans les heures qui suivent l'injection). Les sels d'aluminium induisent par ailleurs la

différenciation des macrophages en cellules dendritiques et favorisent la production de réponses immunitaires Th2 et d'anticorps (Blin, 2019).

Les antigènes vaccinaux de poids moléculaire élevé ayant une charge négative à pH 7 sont capables de s'adsorber à la surface des agrégats du gel aluminique, mais sans pénétrer à l'intérieur de la structure. Ce phénomène d'adsorption a des impacts directs sur l'activité du vaccin. On a montré chez l'animal une corrélation entre la capacité d'adsorption de l' Al(OH)_3 et la réponse immunitaire aux vaccins tétanique et diphtérique : plus la capacité d'adsorption est forte et plus l'activité de ces vaccins est élevée (Gupta & Siber, 1995).

1.5. Choix de la voie d'induction

Bien que plusieurs chercheurs aient adopté la voie orale pour induire une allergie alimentaire chez les souris (Liu et al., 2008 ; Rupa et al., 2012), cette dernière présente le risque de provoquer une tolérance des allergènes introduits, particulièrement dans le cas d'utilisation de faible dose d'allergènes, d'immuniser avec un aliment hypoallergénique et/ou de créer un modèle animal sans adjuvant. Les variétés d'arachide utilisées dans notre étude n'ont jamais fait l'objet d'investigation sur leur pouvoir allergénique c'est la raison pour laquelle la voie intrapéritonéale est considérée comme le meilleur choix dans notre cas. Dans ce même contexte, l'étude de Karine adel-patient et ses collaboratrices réalisées en 2005 pour évaluer la réaction anaphylactique des souris Balb/c contre l'arachide et le lait de vache a montré une réaction comparable entre les souris sensibilisées par la voie orale et celles sensibilisées par la voie intrapéritonéale surtout sur le plan de production d'anticorps spécifiques de type IgE et IgG1.

2. Induction de l'allergie aux protéines de l'arachide chez les souris Balb/c

Tous les groupes de souris traitées ont reçu des injections intrapéritonéales (ip) de 10 μg de protéines d'arachide adsorbées sur 2 mg d'alum [Al(OH)_3] dans un volume de 0,1 ml de tampon PBS 0,1X, pH 7,4 (Annexe 7). Les injections sont effectuées dans les jours 0, 14, 21 et 28 (HogenEsch, 2002). Les souris ont reçu une dose de 1mg de protéine dissoute dans le même volume du tampon en absence d'adjuvant au jour 35 afin de provoquer la réaction allergique et d'évaluer les symptômes du choc anaphylactique. En parallèle, un groupe de 10 souris a été utilisé comme lot témoin n'ayant reçu que des injections de 100 μl de tampon PBS sans protéines et sans adjuvant (Figure 2).

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de l'aorte abdominale 2 heures avant l'injection pour les jours de sensibilisation 0, 14, 21 et le jour 28 et 30 minutes après l'injection pour le jour du test de provocation (jour 35). Enfin, les échantillons de sang récupéré ont été centrifugé et le sérum récupéré a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

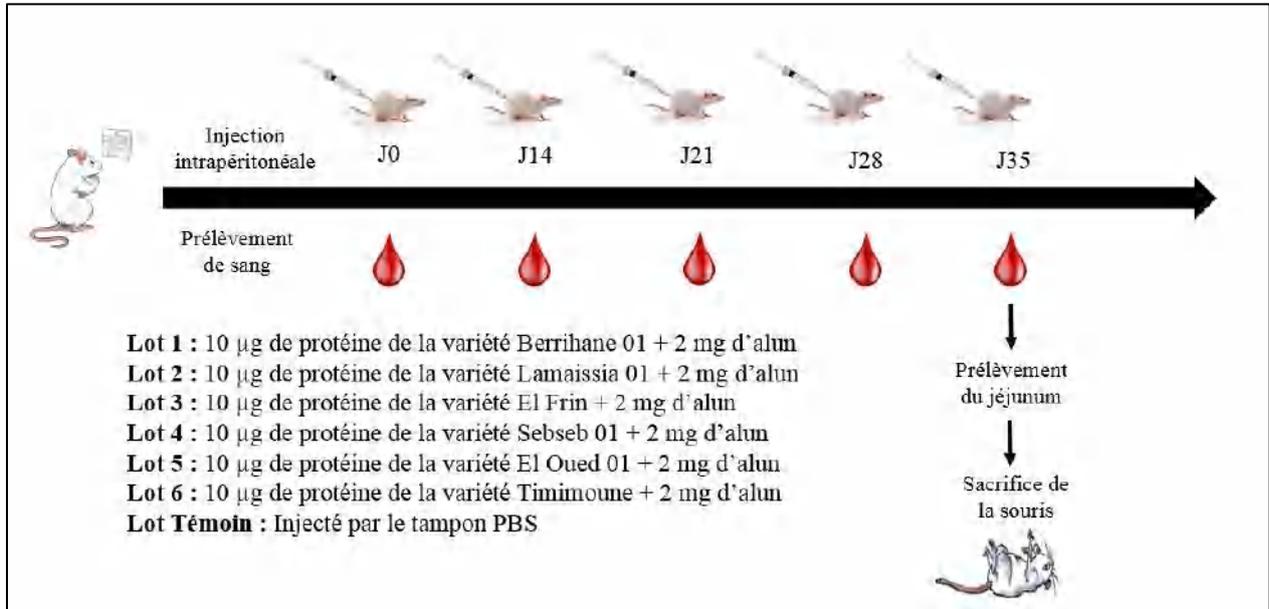


Figure 3. Schéma du calendrier des immunisations.

Des prélèvements du jéjunum des souris ont été également effectués pour tous les lots de souris traitées et le lot de souris témoins (Figure 3).



Figure 4. Dissection de souris (a) aorte abdominale (b) prélèvement du jéjunum

2.1. Dosage des anticorps par la technique ELISA

Les titres d'anticorps spécifiques pour les différents isotypes d'immunoglobulines : IgG totale, IgG1, IgG2a et IgE ont été mesurés par la technique ELISA de type indirect et de type sandwich en utilisant des microplaques de 96 puits à fond plat. Tout d'abord, la plaque a été sensibilisée par 100 µl de protéine des différentes variétés à une concentration de 15µg/ml pour les isotypes IgG et 100µg/ml pour les IgE, la plaque a été ensuite incubée pendant une nuit à 4°C sous une agitation douce. Après trois lavages avec du PBS, Tween 20, 0,05% (PBS/Tw), 150 µl de PBS-Tween, BSA 3% sont déposés dans les puits et la microplaque est incubée pendant deux heures à 37 °C sous agitation. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois avec du PBS-Tween avant d'être incubés avec 100 µl du sérum des souris dilués dans du PBS-Tween BSA 1%, (1:1000 pour les isotypes IgG et 1:50 pour les anticorps IgE) puis incubés pendant 2 h à 37°C sous agitation. Un autre lavage est effectué avec du PBS/Tw avant le dépôt de 100 µl des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) (une dilution de 1:2500, Invitrogen, 62-6520 pour les IgGt ; une dilution de 1:7500, Abcam, ab97240 pour les IgG1 et une dilution de 1:4000, Southernbiotech, 1110-05 pour les IgE) et l'incubation de la plaque pendant 90 min à 37°C sous agitation. Après l'incubation, l'excès des anticorps secondaires est éliminé par trois lavages avec du PBS/Tw. Enfin, 100 µl d'une solution fraîchement préparée de l'H₂O₂ associée au chromogène OPD (Ortho Phényl Diamine, SIGMA p8287) (Annexe 7) ont été ajoutés à chaque puits et la réaction a été arrêtée après 30 min en ajoutant 50 µl de l'acide sulfurique (H₂SO₄ 2N). L'absorbance à 490 nm a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaque (EnSpir, Multimode Plate Reader). Les concentrations des IgE dirigées contre les allergènes de l'arachide ont été déterminées en utilisant des anticorps IgE de souris non marquées (Southernbiotech, 1110-01) comme standard. Des témoins négatifs sont inclus dans chaque plaque afin de contrôler la spécificité et la sensibilité de chaque mesure. Par ailleurs, la concentration de la sous classe des anticorps de type IgG2a a été mesurée en utilisant un kit de dosage par la technique ELISA de type sandwich (IgG2a Mouse Uncoated ELISA Kit 88-50420-88) contre une gamme de contrôle.

2.2. Détection des allergènes par western blot (Immunoempreinte)

Les protéines extraites des graines d'arachides ont été utilisées pour effectuer un immun-transfert indirect des IgE. Tout d'abord, les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide à gradient (6-15%). Après la migration, le gel a été démoulé puis trempé dans le tampon de Transfer durant 1 à 2 minutes (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,05 % SDS, 10 %

méthanol, pH 8,3). Le gel est placé par la suite dans la cassette du transfert où le sandwich se compose d'une membrane de PVDF (Amersham Hybond Sequencing 0,2 µm) activé par le méthanol, 2 feuilles de papier wattman et deux éponges. Le transfert a été effectué avec un courant de 220mA pendant 12 min dans un milieu semi sec. La membrane a été par la suite saturée par une solution de TBS tween 1% pendant 2 h à température ambiante sous une agitation douce. Après incubation, la membrane a été divisée en rubans qui correspondait aux profils des protéines des différentes variétés afin de les traitées par les sérums de souris respectifs dans l'étape suivante. Après trois lavages par le tampon de lavage (TBS-Tween 0,5%), les rubans ont été incubés séparément pendant une nuit dans les sérums de souris à une dilution de 1 :100. Après un deuxième lavage, les rubans ont été incubées pendant 2 heures avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dirigée contre les IgE de souris dilué à 1 :4000 (Goat Anti-Mouse IgE-HRP, Southern Biotech 1110-05). Enfin, les bandes ont été lavées puis développées à l'aide d'un substrat chimioluminescent (ECL-Plus, Thermofisher). Les bandes d'allergènes développées ont été détectées par le système d'imagerie ChemiDoc (Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software).

2.3. Analyse statistique des données

Les résultats du test ELISA sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard. Les comparaisons entre les groupes ont été effectuées en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) avec les tests de Tukey et Dunnett en utilisant le logiciel XLSTAT. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

2.4. Signes cliniques : test de provocation

Les symptômes du choc anaphylactique sur les souris ont été évalués 30 min après une provocation par voie intrapéritonéale avec 100 µl de PBS contenant 1 mg de protéine. La classification admise pour mesurer les manifestations allergiques est la suivante (Schülke & Albrecht, 2019):

0 : aucun symptôme

1 : gratter et frotter autour du nez et de la tête

2 : gonflement autour des yeux et de la bouche, diarrhée, pilier dressé, activité réduite et/ou activité réduite avec augmentation de la fréquence respiratoire

3 : respiration sifflante, respiration laborieuse et cyanose autour de la bouche et de la queue ;

4 : aucune activité après avoir poussé ou des tremblements et des convulsions

5 : la mort.

2.5. Etude histologique

Sur le plan histologique, une allergie alimentaire peut provoquer classiquement une atrophie villositaire au niveau de l'intestin grêle associée à une infiltration lymphocytaire de l'épithélium et des altérations entérocytaires ainsi qu'un allongement des cryptes (Patey-Mariaud de Serre et al., 1998).

Une nuit avant le test de provocation, les souris ont été privées d'aliment. Après le sacrifice, des fragments du jéjunum ont été récupérés et rincés avec de l'eau physiologique afin d'éliminer les traces des déchets probablement restés dans les intestins. Après lavage, les fragments ont été traités par inclusion dans la paraffine selon la méthode de Hould method (1984). Cette méthode comporte différentes étapes à respecter impérativement.

2.5.1. La fixation

Cette étape a pour but de tuer les cellules en les conservant, autant que possible, à l'état où elles se trouvaient pendant la vie. Cependant, cette étape comprend des risques d'autolyse des cellules ce qui peut affecter la qualité des coupes histologiques.

Les fragments du jéjunum rincés ont été fixés dans du formol à 10%. Le formol est l'un des meilleurs fixateurs des protéines, il convient mieux aux gros fragments car il a la propriété de pénétrer rapidement et de se fixer lentement (Coujard, 1980). Il se polymérise avec les polypeptides entraînant leur insolubilisation.

2.5.2. Déshydratation et clarification

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique. Cette étape doit se faire progressivement, où les tissus seront trempés dans des bains d'éthanol à concentration progressive jusqu'à l'éthanol absolu.

La clarification est le passage des prélèvements dans un liquide intermédiaire afin d'éliminer les traces d'alcool absolu utilisé pour le dernier bain de déshydratation. On utilise dans cette étape un solvant comme le xylène ou le toluène, favorable aux échanges membranaires afin de faciliter l'élimination de l'alcool et de préparer l'imprégnation de la paraffine.

Les fragments du jéjunum ont été déshydratés et imprégnés dans un automate de déshydratation des tissus (Thermo scientifique, Citadel 2000) où les fragments ont été incubés pendant 1 heure dans chaque bain d'alcool de concentration croissante (60° jusqu'à 100°). Toutefois la clarification des fragments du jéjunum a été effectuée dans deux bains de xylène sur le même automate avec une incubation d'une heure dans chaque bain.

2.5.3. Inclusion à la paraffine

Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines (d'une épaisseur de 2 à 5 µm) et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine (résine blanche opaque).

Dans cette étude, les échantillons ont été imprégnés dans la paraffine liquide préchauffée à 56°C pendant 12 heures. Une fois les pièces sont imprégnées de paraffine, elles ont été coulées dans des moules métalliques de façon à ce que la surface à couper étant posée contre le fond du moule. Par la suite, des cassettes en plastique seront fixées au-dessus et le volume sera complété avec de la paraffine. Le refroidissement de cette paraffine amène sa solidification en un bloc prêt à être coupé. Cette étape se fait dans un système d'intégration de la paraffine (Thermo scientifique, Histostar), on obtient alors un bloc de consistance homogène qui peut être coupé aisément par le microtome.

2.5.4. Traitement des lames ou microtomie

La confection d'une coupe nécessite un microtome muni d'un rasoir. Il permet l'obtention de rubans de paraffine dans lesquels un ou plusieurs échantillons sont choisis et étalés sur lame. Avant de procéder à cette étape, un dégrossissage du bloc est nécessaire, pour obtenir la totalité de la surface du prélèvement inclus en paraffine.

Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide de microtome (Leica, RM2235), les coupes sélectionnées sont détachées du ruban avec des aiguilles lancéolées et sont mises dans un bain marie à 41 °C où elle se défriquent par l'action de chaleur en 30 secondes environ ce qui facilitera la récupération des coupes qui collent facilement à la surface des lames.

2.5.5. Déparaffinage et réhydratation

Avant de procéder à la coloration, les coupes doivent être débarrassées de la paraffine qui les couvre et réhydratées. Pour cela les lames sont incubées pendant 10 min dans 2 bains de xylène successif.

L'étape de réhydratation a pour but de retirer le xylène des tissus et le remplacer par l'eau. Elle se fait par l'incubation des lames pendant 10 minutes dans 4 bains successifs d'alcool

de degrés décroissants (100°, 100°, 90°, 70°) suivis d'un rinçage à l'eau de robinet pendant 3 min.

2.5.6. Coloration

La coloration est destinée à rendre les organites de la cellule visible. En effet certains constituants tissulaires retiennent certains colorants plutôt que d'autres, il existe une électivité de la coloration. Généralement, on utilise deux ou plusieurs colorants qui se fixeront sur des structures différentes, accentuant les contrastes et permettant une bonne polychromie (Bensalem, 1998).

Les lames ont été colorées par la méthode Hématoxyline-Eosine qui représente la plus simple des colorations combinées. Cette étape est effectuée dans un automate de coloration (Thermo scientifique, Varistain 24-4) avec un protocole qui comprend les étapes suivantes :

1. Incubation dans l'hématoxyline pendant 2 min
2. Rinçage à l'eau de robinet pendant 3 min
3. Incubation dans une solution Alcool acide à 1% (composé de 1 ml d'HCl et 100 ml de l'éthanol à 70%) pendant 10 sec
4. Rinçage à l'eau de robinet pendant 3 min
5. Incubation dans l'Eosine (1%) pendant 3 min
6. Rinçage rapide 3 fois
7. Incubation dans l'EtOH à 70% pendant 5 min
8. 1^{ère} incubation dans l'EtOH 100% pendant 5 min (Bac n°1)
9. 2^{ème} incubation dans l'EtOH 100% pendant 5 min (Bac n°2)
10. 1^{ère} incubation dans le Xylène pendant 5 min (Bac n°1)
11. 2^{ème} incubation dans le Xylène pendant 5 min (Bac n°2)

2.5.7. Montage des préparations et observation microscopique

Les préparations sont montées en appliquant les lames immédiatement après leur récupération du xylène contre une lamelle contenant une goutte du milieu DPX Mountant for histology qui sert à coller cette dernière à la lame. Les lames préparées sont laissées sécher puis observées sous un microscope optique (LEICA DM 1000 LED) couplé à une caméra de haute résolution.

Résultats

Partie I

Diversité morphologique, biochimique et moléculaire de l'arachide

Chapitre I

**Diversité génétique des accessions
d'arachide algérien (*Arachis hypogaea*)
analysée par les marqueurs morphologiques
et les protéines de réserve**

Préambule

L'Algérie est un grand centre de diversité biologique ; sa position géographique et la structure de ses étages bioclimatiques font de ses terroirs un gisement relativement important de ressources génétiques. Parmi ces ressources naturelles on trouve l'arachide, une légumineuse utilisée à la fois pour l'alimentation humaine et animale ainsi que dans l'industrie oléagineuse.

Grace à la grande diversité climatique du pays, les variétés d'arachides algériennes présentent plusieurs qualités tant sur le plan morphologique qu'agronomique. Cependant, malgré ses multiples avantages cette culture a connu une grande marginalisation sous l'ombre d'une importation massive.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail, qui a pour objectif de revaloriser les variétés d'arachide algériennes à travers une caractérisation morphologique d'un côté et une caractérisation biochimique de l'autre. Dans ce premier chapitre, une **revue de synthèse publiée dans le journal *Proceedings on applied botany, genetics and breeding en 2021*** présente une vue globale sur i) la caractérisation des accessions d'arachide actuellement cultivées dans les quatre principales zones de culture en Algérie, ii) l'appréciation de la diversité phénotypique pour différents descripteurs morphologiques et traits agronomiques, iii) la révélation de l'importance de ces traits en plus de leurs interrelations, iv) et l'évaluation de la diversité des protéines de réserve des graines dans l'arachide pour l'identification des accessions d'arachide étudiées.

A cet égard, une collection de 30 variétés d'arachide algériennes a fait l'objet d'une investigation morphologique en utilisant 40 caractères variétaux dont 15 caractères morphométriques et 25 caractères agronomiques. Dans la deuxième partie du travail une caractérisation biochimique a été effectuée en utilisant les protéines de réserve séparées par la méthode SDS-PAGE.

L'appréciation de la diversité par les deux méthodes en l'occurrence l'utilisation des marqueurs morphologiques et biochimiques a fait ressortir 3 grands groupes de cultivars d'arachides dont 2 groupes étaient composés des accessions originaires des wilayas de Taref et d'El Oued. La répartition a mis également en évidence le rôle crucial des conditions éco-géographique et de l'affiliation des accessions à la sous-espèce dans leurs répartitions.

Enfin, les résultats ont montré aussi que les accessions d'El Oued présentent les meilleurs caractères agro-morphologiques et peuvent être fortement recommandées pour la culture et la production de sous-produits de l'arachide.

**Article 1: Genetic diversity of the Algerian peanut population analyzed
using morphological markers and seed storage proteins**

Hanene Djeghim, Ines Bellil, Douadi Khelifi

**PROCEEDINGS ON APPLIED BOTANY, GENETICS AND
BREEDING 182 (3), 2021**

Genetic diversity of the Algerian peanut population analyzed using morphological markers and seed storage proteins

DOI: 10.30901/2227-8834-2021-3-9-22
 УДК 633.852.52:631.526.32:631.527(65)
 Поступление/Received: 18.03.2021
 Принято/Accepted: 02.09.2021



H. DJEGHIM¹, I. BELLIL², D. KHELIFI³

¹ National Center for Biotechnology Research,
 P.O. Box E73, Nouvelle Ville Ali Mendjeli, Constantine 25016,
 Algeria

✉ livenanou@hotmail.com

² Frères Mentouri University,
 P.O. Box 325, Aïn El Bey Wuy, Constantine 25017, Algeria

✉ bines07@yahoo.fr

³ National School of Biotechnology,
 P.O. Box E66, Ville Universitaire Ali Mendjeli, Constantine
 25100, Algeria

✉ dkhelifi@yahoo.fr

Генетическое разнообразие
 алжирской популяции арахиса, изученной
 с использованием морфологических маркеров
 и запасных белков семян

Х. ДЖЕГХИМ¹, И. БЕЛЛИЛЬ², Д. КХЕЛИФИ³

¹ Национальный центр биотехнологических исследований,
 25016 Алжир, г. Константин, Нувель Вилль Али
 Менджели, п/я E73

✉ livenanou@hotmail.com

² Университет Фрэр Ментури,
 25017 Алжир, г. Константин, пр. Айн Эль Бей, п/я 325

✉ bines07@yahoo.fr

³ Национальная высшая школа биотехнологии,
 25100 Алжир, г. Константин, Вилль Университэр Али
 Менджели, п/я E66

✉ dkhelifi@yahoo.fr

Background. The peanut is one of the most important oil crops suitable for cultivation in the tropical areas of the world. Despite its agronomic importance, few studies have been carried out to assess the morphogenetic diversity of *Arachis hypogaea* L., especially in East African countries. The major interest of this morphologic study lies in the potential of this species to provide useful genes for the improvement of cultivated peanuts. To date, no study has been performed in Algeria to characterize local peanut varieties. **Materials and methods.** Thirty peanut accessions were collected from four principal areas of peanut production in Algeria. Genetic characterization using 15 agronomic characters and 25 morphological descriptors showed a high level of diversity among accessions. Principal Component Analysis and the Hierarchical Ascendant Classification were made to clarify the genetic relationship between peanut accessions.

Results and discussion. Results showed that leaflet size (length and width), seed shape and size, oil content, and branching pattern were the principal characters to discriminate the screened *A. hypogaea* accessions. In addition to that, the weights of 10 pods and 100 seeds were the most variable traits and presented a CV of 42.53% and 40.12%, respectively. On the other hand, total storage proteins extracted were separated using SDS-PAGE and revealed thirty bands that were used to generate a matrix and make a cluster analysis using the UPGMA method, exhibiting different storage proteins compositions. Moreover, the phenotypic diversity observed agrees with the storage protein profile diversity, while the accessions grouped in similar clusters belong to the two subspecies of *A. hypogaea*. The results of the current study show that morphological traits and seed storage proteins can be useful for exploring the diversity among *A. hypogaea* accessions.

Актуальность. Арахис – одна из важнейших масличных культур, пригодных для возделывания в тропических зонах мира. Несмотря на его хозяйственную ценность, были предприняты лишь редкие попытки изучить и оценить морфогенетическое разнообразие *Arachis hypogaea* L., особенно в странах Восточной Африки. Основная цель настоящего морфологического исследования – изучить потенциал данного вида как источника ценных генов для улучшения культурных форм арахиса. До сегодняшнего дня в Алжире не проводились исследования по выявлению характеристик местных сортов арахиса.

Материалы и методы. Тридцать образцов арахиса собрали в четырех основных районах его производства в Алжире. Генетическая характеристика с использованием 15 агрономических и 25 морфологических признаков показала высокий уровень разнообразия среди образцов. Для выяснения генетической взаимосвязи между образцами арахиса провели кластерный анализ и анализ главных компонент.

Результаты и обсуждение. Показано, что размер листочков (длина и ширина), форма и размер семян, содержание масла и характер ветвления были основными признаками, позволяющими различить отобранные образцы *Arachis hypogaea* L. В дополнение к этому, массы 10 бобов и 100 семян были наиболее изменчивыми характеристиками и имели CV 42,53% и 40,12% соответственно. Был проведен анализ запасных белков семян. Все они были разделены с использованием метода SDS-PAGE, который выявил тридцать полос. Последние были использованы для создания матрицы и кластерного анализа методом UPGMA и продемонстрировали различия образцов арахиса по составу запасных белков. Наблюдаемое фенотипическое разнообразие согласуется с разнообразием профиля запасных белков, и группы образцов в сходных кластерах принадлежали двум подвидам *A. hypogaea*. Результаты данного исследования показывают, что морфологические признаки и запасные белки семян могут быть полезны для изучения разнообразия образцов арахиса.

Key words: *Arachis hypogaea*, phenotypic diversity, Principal Component Analysis, SDS-PAGE.

Ключевые слова: *Arachis hypogaea*, фенотипическое разнообразие, анализ главных компонент, SDS-PAGE.

Introduction

Peanut, or groundnut (*Arachis hypogaea* L.), is an important oilseed crop cultivated worldwide. In 2018, 45.9 million tons were produced over an area of 28.5 million hectares (FAOSTAT, 2020). *A. hypogaea* can play an important role in sustainable agricultural development, particularly where drought and salinity frequently limit crop production in the Maghreb and the sub-Saharan regions (Giuffrè et al., 2016). Peanut cultivars have a very narrow genetic base, and there is a lack of information about their morphological and agricultural characteristics. Accurate information on genetic diversity helps the plant breeders in choosing the diverse parents for focused hybridization (Kushwah et al., 2016). Additionally, analysis of storage proteins is considered one of the most powerful methods for describing plant species and lines (Liang et al., 2006). Thus, the aim of the present study was to characterize the peanut accessions currently cultivated in the four main growing areas in Algeria. The specific objectives of the investigation were to estimate phenotypic diversity for different morphological descriptors and agronomic characters, reveal the importance of these traits in addition to their interrelationships, and assess the seed storage protein diversity in peanut for identification of accessions.

Material and methods

Thirty peanut (*A. hypogaea*) accessions were collected from different peanut growing areas in Algeria (Fig. 1), including El Taref, Ghardaïa, El Oued, and Adrar (Table 1). Seedlings were grown and maintained under greenhouse conditions at the National Center for Biotechnology Research in Constantine, Algeria (36°24.75' N, 6°57.05' E, and 773 m above sea level). During their growth, plants were irrigated as needed. Finally, seeds were collected manually, air-dried in the dark, and stored in paper bags at 4°C.

1. Plant characters measured

Two selected categories of characters from the IBPGR/ICRISAT peanut (groundnut) descriptors (Descriptors for Groundnut, 1992) were studied: qualitative (morphological) and quantitative (agronomic) characters. They were scored with two to fifteen states and were analyzed. These parameters were measured in three replicates per accession (Table 2).

1.1 Oil content

To measure oil content in peanut accessions, oil was extracted using the Soxhlet apparatus (FOSS, SoxtecTM 8000), for each 1 g of kernel peanut placed on the thimbles, 25 ml of hexane was poured on the extraction vessels. The difference of vessel weight before and after extraction showed oil content. The oil content of each accession was measured in triplicate and results were expressed as the percentage of total oil content.

1.2. Storage protein extraction

Storage proteins were extracted from single crushed seeds according to U. K. Laemmli's (1970) protocol with minor modifications. After removing the skin, the peanut kernels were finely milled and defatted with hexane (10 ml/g dry weight) at -20°C overnight. 100 mg of dry peanut powder was mixed with 100 µl of fresh extraction solution, the mixture was incubated at 65°C for 30 min and then centrifuged 1 min at 10,000 g.

2. Data analysis

Quantitative morphological data were first subjected to descriptive analysis and ANOVA tests and the correlation matrix was performed on all quantitative characters to determine the relationships between them. The frequency table was used for a comparison of means by the analysis of variance (ANOVA) using Tukey's test ($p < 0.05$). The structure of morphological diversity was described using Principal Component Analysis (PCA), and the Hierarchical Ascendant Classification (CAH) was used to explore the relationship between



Fig. 1. Map of sampling locations for peanut accessions

Рис. 1. Карта мест сбора образцов арахиса

Table 1. Geographic origin of the studied Algerian peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions
Таблица 1. Географическое происхождение изученных алжирских образцов арахиса (*Arachis hypogaea* L.)

Geographic origin	Region where collected / location	Accessions name	Geographic zone	Bioclimatic floor
Taref	Berrihane, El Kala	Berrihane 1	Coastal	Subhumid
		Berrihane 2		
	Lamaissia, El Kala	Lamaissia 1		
		Lamaissia 2		
	Chefia, El Kala	Chefia 1		
		Chefia 2		
	El Kala	El Kala 1		
		El Kala 2		
		El Kala 3		
		El Kala 4		
	El Frin, El Kala	El Frin		
	Boumalek, El Kala	Boumalek		
Oum Tboul, El Kala	Oum Tboul			
Tonga-Ouest, El Kala	Tonga-Ouest			
Ghardaïa	Sebseb	Sebseb 1	Northern Sahara	Saharan
		Sebseb 2		
		Sebseb 3		
	El Mansoura	El Mansoura		
	Metlili	Metlili		
El Oued	Boubeiadha, Taghzout	Boubeiadha 1	Northern Sahara	Saharan
		Boubeiadha 2		
	Guemar	El Oued 1		
	Bagouza, Taghzout	El Oued 2		
	El Oued	El Oued 3		
		El Oued 4		
Adrar	Charouine	Hiba 1	Central Sahara	
		Hiba 2		
	Ajdir, Timimoune	Adrar 1		
	Talmine, Timimoune	Adrar 2		
	Talmine, Timimoune	Timimoune		

Table 2. Morphological and agronomic descriptors used for statistical analysis

Таблица 2. Морфологические и хозяйственно ценные признаки, использованные в статистическом анализе

	Abbreviation	Character name	Character state	Range - Frequency (%) Average
Morphological descriptors	Stem	Gr.hab	Growth habit 0 - Erect; 1 - Decumbent-1; 2 - Decumbent-2; 3 - Decumbent-3; 4 - Procumbent-2	0 - 46.67; 1 - 10.00; 2 - 3.33; 3 - 36.67; 4 - 3.33
		Bra.pat	Branching pattern 0 - Irregular without flowers on main stem; 1 - Irregular with flowers on main stem; 2 - Alternate; 3 - Sequential	0 - 3.33; 1 - 23.33; 2 - 13.33; 3 - 40.00
		Num.bra	Number of branches 0 - Secondary; 1 - Tertiary	0 - 63.33; 1 - 36.67
		St.pig	Stem pigmentation 0 - Absent; 1 - Present	0 - 50.00; 1 - 50.00
		St.src	Stem surface 0 - Glabrous; 1 - Sub-glabrous, hairs in one or two rows along the main stem; 2 - Moderately hairy, three or four rows along the main stem; 3 - Very hairy, most of the stem surface covered with hairs; 4 - Woolly	0 - 30.00; 1 - 40.00; 2 - 6.67; 3 - 0.00; 4 - 3.33
		Bch.dty	Branching density 0 - Moderate; 1 - High	0 - 20.00; 1 - 80.00
	Flower	Inf.typ	Inflorescence type 0 - Simple; 1 - Complex	0 - 26.67; 1 - 73.33
		Peg.pig	Peg pigmentation 0 - Absent; 1 - Present	0 - 56.67; 1 - 43.33
		Std.pet.col	Standard petal color 0 - Yellow 9B; 1 - Orange 24A	0 - 66.67; 1 - 33.33
		Flo.dis	Flower distribution 0 - Alternate; 1 - Complex; 2 - Continuous	0 - 33.33; 1 - 20.00; 2 - 46.67
	Leaflet	Lfit.shp	Leaflet shape 0 - Oblong-lanceolate; 1 - Oblong; 2 - Obovate; 3 - Ovate; 4 - Suborbicular; 5 - Wide-elliptic; 6 - Narrow-elliptic; 7 - Oblong-elliptic; 8 - Elliptic; 9 - Cuneate	0 - 3.33; 1 - 6.67; 2 - 23.33; 3 - 6.67; 4 - 3.33; 5 - 6.67; 6 - 16.67; 7 - 13.33; 8 - 6.67; 9 - 13.33
		Lfit.src	Leaflet surface 0 - Almost glabrous on both surfaces; 1 - Almost glabrous above, hairs below; 2 - Almost glabrous above, hairs and/or bristles below	0 - 70.00; 1 - 20.00; 2 - 10.00
		Lfit.mgn	Leaflet margin 0 - Entire; 1 - Hairy	0 - 40.00; 1 - 60.00
		Lfit.tip	Leaflet tip 0 - Obtuse; 1 - Acute	0 - 56.67; 1 - 43.33
		Lef.col	Leaf color 0 - Green 129; 1 - Green 134A; 2 - Green 135; 3 - Green 140B; 4 - Green 142; 5 - Yellow-green 144C; 6 - Yellow-green 149	0 - 3.33; 1 - 13.33; 2 - 6.67; 3 - 13.33; 4 - 20.00; 5 - 26.67; 6 - 16.67
	Root	Nod.cap	Nodulation capacity 0 - Without nodules; 1 - With nodules	0 - 80.00; 1 - 20.00
Pod	Pod.csn	Pod constriction 0 - None; 1 - Slight; 2 - Moderate; 3 - Deep; 4 - Very deep	0 - 40.00; 1 - 13.33; 2 - 20.00; 3 - 20.00; 4 - 6.67	
	Txt.pod.src	Texture of pod surface 0 - Fine; 1 - Medium; 2 - Coarse	0 - 20.00; 1 - 13.33; 2 - 66.67	
	Pod.bk	Pod beak 0 - Absent; 1 - Slight; 2 - Moderate; 3 - Prominent; 4 - Very prominent	0 - 13.33; 1 - 20.00; 2 - 50.00; 3 - 3.33; 4 - 13.33	
	Pod.ret	Pod reticulation 0 - None; 1 - Slight; 2 - Moderate; 3 - Prominent; 4 - Very prominent	0 - 10.00; 1 - 36.67; 2 - 3.33; 3 - 23.33; 4 - 26.67	

Table 2. Continued
Таблица 2. Продолжение

		Abbreviation	Character name	Character state	Range - Frequency (%) Average
Morphological descriptors	Seed	Num.sd.pod	Number of seeds per pod	0 - 2-1; 1 - 2-3-1/2-1-3; 2 - 3-2-1/3-1-2	0 - 73.33; 1 - 16.67; 2 - 10.00
		Teg.asp	Tegument aspect	0 - One color; 1 - Variegated	0 - 56.67; 1 - 43.33
		Sd.shp	Seed shape	0 - Round; 1 - Ovate; 2 - Oblong; 3 - Cylindric	0 - 10.00; 1 - 33.33 2 - 33.33; 3 - 23.33
		Teg.col	Tegument color	0 - Orange-yellow 6; 1 - Orange-yellow 19; 2 - Orange 26; 3 - Orange 28; 4 - Orange 29; 5 - Red-orange 31; 6 - Red-orange 33; 7 - Red-orange 34; 8 - Red-orange 35; 9 - Pink-red 37; 10 - Grey-orange 165; 11 - Grey-orange 172; 12 - Grey-orange 175; 13 - Grey-orange 177; 14 - Grey-orange 178	0 - 3.33; 1 - 6.67; 2 - 16.67; 3 - 3.33; 4 - 3.33; 5 - 6.67; 6 - 3.33; 7 - 10.00; 8 - 3.33; 9 - 3.33; 10 - 3.33; 11 - 6.67; 12 - 10.00; 13 - 13.33; 14 - 6.67
		Sd.col	Seed color	0 - Yellow 1; 1 - Yellow 4; 2 - Yellow 5; 3 - Yellow 8; 4 - Yellow 10; 5 - Yellow 13	0 - 3.33; 1 - 63.33; 2 - 3.33; 3 - 13.33; 4 - 10.00; 5 - 6.67
Agronomic descriptors	Stem	Pl.width	Plant width or Spread (cm)	Between 06 to 17	11.00
		Hght.stm	Height of main stem (cm)	Between 28 to 61	33.00
		Dys.mty	Days to maturity	0 - Between 80 to 100 days; 1 - Between 100 to 120 days; 2 - Between 120 to 140 days	0 - 56.67; 1 - 26.67; 2 - 16.67
	Flower	Dys.50%.fwg	Days to 50% flowering	0 - Between 20 and 45 days; 1 - Between 45 and 75 days	0 - 70.00; 1 - 30.00
	Leaflet	Lflt.lgth	Leaflet length (mm)	Between 19.08 to 59.35	40.27
		Lflt.wdth	Leaflet width (mm)	Between 10.44 to 31.45	21.01
		Lef.are	Leaf area (cm ²)	Between 4.29 to 11.22	6.93
		Chlo.ctn	Chlorophyll content (SPAD unit)	Between 27.40 to 49.9	22.50
	Pod	Pod.lgth	Pod length (mm)	Between 10.26 to 55.79	45.53
		Pod.wdth	Pod width (mm)	Between 5.62 to 20.13	14.51
		Wght.10.pods	Weight of 10 pods (gr)	Between 5.32 to 20.92	15.6
	Seed	Wght.100sd	Weight of 100 seeds (gr)	Between 30.37 to 108.4	78.03
		Sd.lgth	Seed length (mm)	Between 8.5 to 22.32	13.79
		Sd.wdth	Seed width (mm)	Between 6.23 to 12.26	6.03
Oil.ctn		Oil content (%)	Between 36.68 to 56.17	19.49	

the peanut accessions using arithmetic averages method (UPGMA); these analyses were carried out using data analysis software (XLSTAT 2016.02).

Concerning data analysis of storage proteins, electrophoresis profiles were analyzed using the Image Lab software version 5.1 (Biorad). The presence/absence of a band was scored as 1/0, respectively, and the employment of the Euclidean distance to the binary matrix served to calculate the pairwise distance among the accessions, which were clustered by the UPGMA method.

Results

1. Variation in morphological and agronomic characters

The frequency of appearance of morphological descriptors in the studied 30 accessions of *A. hypogaea* is presented in Table 2. The analysis of variance (ANOVA) showed a high significant variation ($p < 0.001$) among the peanut accessions for all of 13 agronomical characters assessed. Table 3 discloses a descriptive statistics estimation of all characters. The most variable ones included the weights of 10 pods and 100 seeds that ranged from 5.32 g to 20.92 g with a CV of 42.53%, and from 30.37 g to 108.4 g with a CV of 40.12%, respectively. These results can be attributed to the important variation observed in seed and pod sizes.

2. Relationships between agronomic characters

Pearson's correlation coefficients revealed significant associations among the evaluated different agronomic characters. Generally, stem architecture characters were significantly correlated with seed and pod characters. The highest significant correlation coefficients were noticed between leaflet length / leaflet width and the weight of 10 pods / seed weight ($r = 0.751, p < 0.0001$, and $r = 0.776, p < 0.0001$, respectively). Furthermore, seed length and pod length were positively and significantly correlated ($r = 0.767, p < 0.0001$), hence any restriction of pod growth may cause smaller seeds. These results corroborated those reported by M. A. Zaman et al. (2011). A significant but weak correlation was also observed between leaflet length / plant width ($r = 0.456, p < 0.0001$), oil content / 10 pod weight ($r = 0.330, p < 0.0001$), and between the height of the main stem / pod width ($r = 0.302, p < 0.0001$) (see Table 3). Among leaf characters, leaf length was highly and significantly correlated with leaflet surface ($r = 0.553, p < 0.0001$), but did not correlate with leaf area. On the other hand, branching pattern was inversely correlated with seed length and the weight of 10 pods ($r = -0.594, p < 0.0001$, and $r = -0.554, p < 0.0001$, respectively). Slight correlations were observed between plant width / leaflet shape and growth habit / nodulation capacity ($r = 0.488, p < 0.0001$, and $r = 0.324, p < 0.0001$, respectively).

Table 3. Descriptive statistics estimation of agronomical characters assessed in the studied accessions

Таблица 3. Описательно-статистическая оценка хозяйственно ценных признаков у изучаемых образцов

Quantitative character	Min	Max	Mean \pm SE	CV%	p	Fisher effect size, %
Hght.stm	28.00	61.00	44.93 \pm 7.77	17.30	< 0.0001	13.32
Pl.width	6.00	17.00	9.69 \pm 2.62	26.98	< 0.0001	3.10
Lft.lgth	19.08	59.35	42.27 \pm 8.21	19.43	< 0.0001	4.36
Lft.width	10.44	31.45	21.88 \pm 4.21	19.23	< 0.0001	10.46
Chlo.ctn	27.40	49.90	39.48 \pm 5.23	13.25	< 0.0001	2.36
Lef.ave	4.29	11.22	6.58 \pm 1.39	21.10	< 0.001	7.80
Pod.lgth	10.26	55.79	28.39 \pm 8.89	31.32	< 0.0001	16.52
Pod.width	5.62	20.13	13.41 \pm 3.06	22.84	< 0.0001	1.30
Wght.10 pod	5.32	20.92	11.98 \pm 5.09	42.53	< 0.0001	11.68
Wght.100 sd	30.37	108.40	53.05 \pm 21.29	40.12	< 0.0001	4.75
Sd.lgth	8.53	22.32	14.74 \pm 3.71	25.15	< 0.0001	9.17
Sd.width	6.23	12.26	8.59 \pm 1.38	16.06	< 0.0001	1.91
Oil.ctn	36.68	56.17	45.02 \pm 4.01	8.90	< 0.0001	13.29

Note: SE - standard error, CV% - coefficient of variation, p - probability value

Примечание: SE - стандартная ошибка, CV% - коэффициент вариации, p - уровень значимости

On the other hand, leaflet width and length revealed similar coefficients of variation among the studied accessions (19.23% and 19.43%, respectively) with an important positive correlation confirmed by the principal component analysis (Fig. 2, a). However, these characters; in addition to chlorophyll content, presented the least coefficients of variation (8.90% and 16.06%, respectively).

3. Principal Component Analysis

The relative importance of each character to explain the variation among the 30 *A. hypogaea* genotypes was assessed using the Principal Component Analysis (PCA). The first seven components explained 64.03% of the total variation among the 30 *A. hypogaea* accessions (Table 4). F1 separates accessions on the basis of three characters: branching pat-

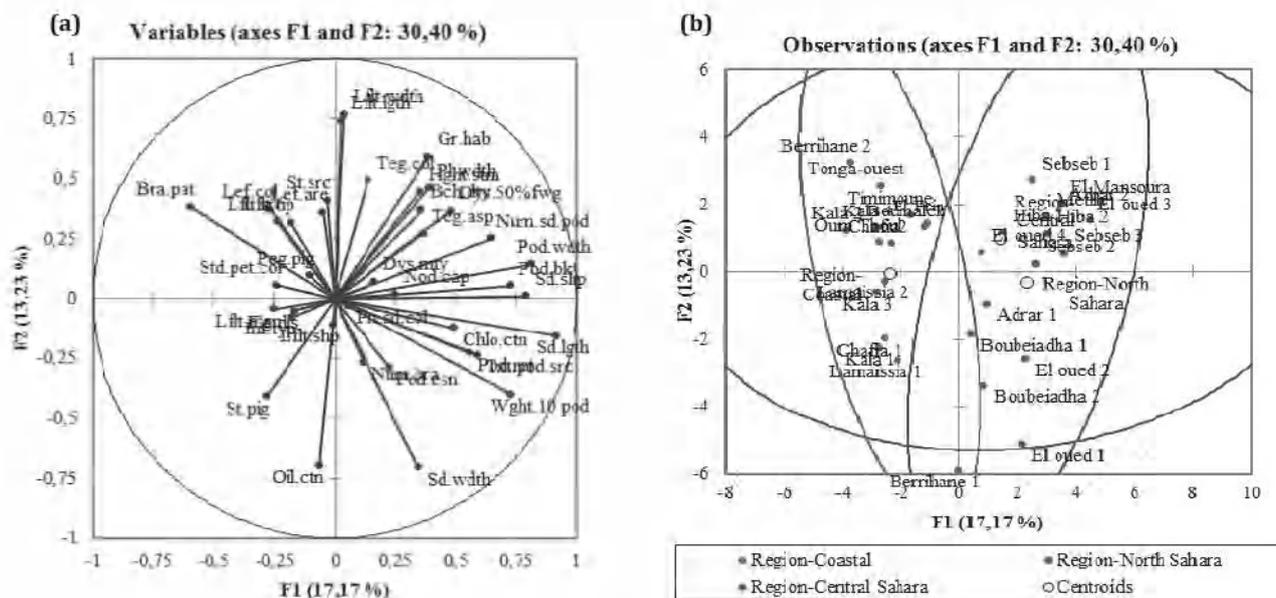


Fig 2. Principal Component Analysis of morphological characters: (a) diagnostic biplot, (b) graph of observations

Рис. 2. Анализ морфологических признаков методом главных компонент: (a) диагностическая диаграмма, (b) график наблюдений

Table 4. First seven principal components related to 38 characters studied in 30 *Arachis hypogaea* L. genotypes assessed

Таблица 4. Первые семь главных компонент для 38 изученных признаков у 30 проанализированных генотипов *Arachis hypogaea* L.

	Principal component axis						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Eigen value	6.526	5.028	3.071	2.834	2.770	2.297	1.805
Variability (%)	17.174	13.231	8.081	7.459	7.291	6.044	4.751
Cumulative %	17.174	30.404	38.485	45.944	53.235	59.279	64.030
Eigen vector loadings							
Gr.hab	0.152	0.264	0.161	-0.203	0.055	0.116	-0.117
Bra.pat	-0.232	0.171	0.040	-0.110	0.136	0.037	-0.164
Num.bra	0.046	-0.120	0.333	-0.060	-0.210	0.093	0.147
Hght.stm	0.138	0.198	-0.061	0.080	-0.027	-0.186	0.058
Pl.width	0.152	0.205	0.187	0.005	-0.073	0.060	-0.015
St.pig	-0.110	-0.184	0.205	0.082	0.133	0.353	0.014
St.src	-0.012	0.183	0.100	0.322	-0.131	0.186	0.036
Inf.typ	-0.068	-0.034	0.350	-0.193	0.024	0.115	0.125
Std.pet.col	-0.095	0.025	0.076	-0.053	-0.050	0.062	0.392
Peg.pig	-0.041	0.043	-0.331	-0.143	-0.243	0.138	0.048
Flo.dis	-0.065	-0.022	-0.224	0.037	-0.180	0.033	-0.326
Lef.col	-0.105	0.166	-0.182	0.024	0.174	0.002	0.190
Lfl.lgth	0.008	0.331	0.152	0.056	-0.062	0.201	-0.019
Lfl.width	0.015	0.343	0.079	0.064	0.081	0.057	-0.155

Table 4. Continued
Таблица 4. Продолжение

	Principal component axis						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Lft.shp	-0.002	-0.048	-0.193	-0.028	0.061	0.402	0.172
Lft.src	-0.093	0.144	0.165	0.356	-0.042	0.144	-0.168
Lft.mgn	-0.099	-0.018	0.120	0.279	-0.228	0.024	-0.181
Lft.tip	-0.072	0.142	-0.083	-0.012	-0.309	0.000	-0.001
Dys.50%fwg	0.189	0.163	0.044	-0.052	0.136	-0.237	0.176
Dys.mty	0.065	0.032	-0.040	0.237	0.356	-0.125	0.160
Chlo.ctn	0.193	-0.054	0.135	-0.001	-0.177	-0.239	0.331
Bch.dty	0.141	0.165	0.252	0.145	-0.224	-0.128	0.034
Nod.cap	0.098	0.008	-0.043	0.096	-0.196	0.391	0.236
Lef.ave	-0.019	0.162	0.021	-0.140	0.395	0.227	0.019
Pod.csn	0.089	-0.130	0.132	-0.281	-0.225	-0.033	-0.087
Num.sd.pod	0.253	0.112	0.096	-0.206	0.112	0.045	-0.014
Txt.pod.src	0.231	-0.105	-0.110	0.122	-0.012	0.026	-0.324
Pod.bk	0.284	0.024	0.059	-0.168	-0.125	-0.051	-0.082
Pod.ret	0.219	-0.103	-0.052	0.048	-0.039	0.300	0.015
Teg.asp	0.145	0.120	-0.184	-0.182	-0.114	0.052	-0.101
Teg.col	0.053	0.220	0.037	0.282	0.102	-0.150	0.024
Pri.sd.col	-0.022	-0.013	-0.248	0.261	-0.133	-0.005	0.362
Oil.ctn	-0.025	-0.311	0.271	0.024	0.105	0.031	-0.030
Pod.wdth	0.319	0.065	-0.088	0.050	-0.028	0.092	-0.032
Wght.10 pod	0.285	-0.180	0.058	0.188	0.117	0.034	-0.077
Sd.wdth	0.136	-0.315	0.032	0.234	0.117	-0.044	-0.101
Sd.lgth	0.358	-0.070	-0.053	0.029	0.055	0.034	0.015

tern, seed length, and pod width. Concurrently, F2 separates accessions on the basis of four characters: leaflet width and length, seed width, and oil content. According to the study by S. T. Katzamanidis et al. (2006), the major botanical accessions of *A. hypogaea* were previously classified on the basis of leaf and stem morphological differences. PCA results also revealed that leaflet size (length and width), seed shape and size, oil content, and branching pattern were the principal characters to discriminate between the examined *A. hypogaea* accessions. On the other hand, characters which have a low loading in the distinction of accessions were growth habit and leaf color for F1, and peg pigmentation and days to maturity for F2.

These results agree with those reported by P. Mahalakshmi et al. (2005), Idi Garba et al. (2015), and F. B. Neya et al. (2017). Regarding the regional distribution on the graph of observations (see Fig. 2, b), two main groups can be distinguished. The first group is composed of accessions from the coastal region, while the second one of those from the northern Saharan region. A third small group can be observed, in-

corporating accessions from the central Sahara. The accessions from the coastal region were characterized by an alternate and sequential branching pattern, with flowers on the main stem, and small seed length and pod width. However, accessions from the northern Sahara presented an irregular branching pattern, without flowers on main stem. These accessions were characterized by high seed length and pod width. The third group consisted of accessions with more restricted distribution; accessions of this group were distinguished by a large size of leaflets and poor oil content.

4. Relationships among the studied accessions according to morphological characters

The relationships among the 30 *A. hypogaea* accessions based on the studied morphological characters were assessed using cluster analysis. The typology of the dendrogram clustered the 30 accessions into two major groups identified as I and II, using a dissimilarity index limit of 157.64 (Fig. 3). The number of genotypes per cluster varied from 5 in cluster II to 13 in cluster I. Cluster I represented 43.33% of the studied population, including 12 accessions originated from Taref and

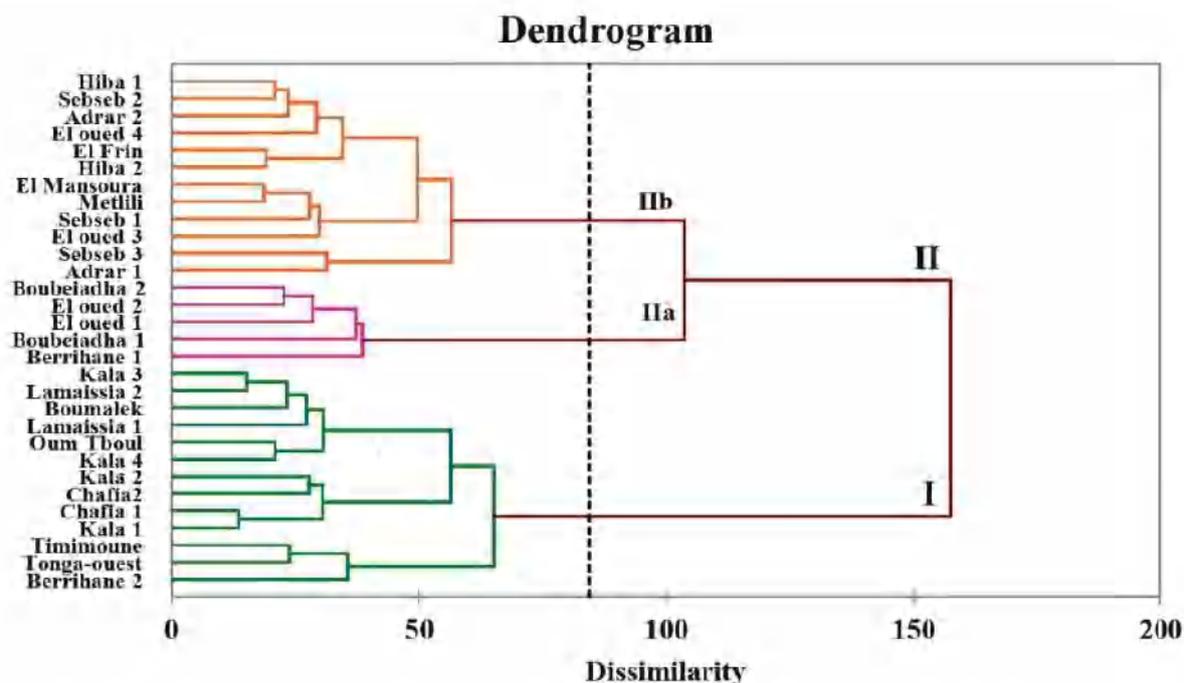


Fig. 3. Dendrogram based on the UPGMA method showing the relationships among the studied accessions

Рис. 3. Дендрограмма на основе метода UPGMA, показывающая взаимосвязи среди изучаемых образцов

the only Timimoune accession from Adrar (see Table 1). This cluster was the most distinguished and the remoter one, supposedly because of the particular subhumid climate in the region of Taref.

The second major cluster (II) grouped most of the accessions originated from the northern and central Saharan regions and corresponded to 56.67% of the total studied population; this cluster was divided into two subclusters, IIa and IIb. The first subcluster, IIa, contains five accessions, four of which were from El Oued, whereas one accession originated from Taref (see Fig. 3 and Table 1), representing 16.66% of the total studied population. Twelve accessions representing 40% of the total population, including those of different origin, namely Ghardaïa, Taref, El Oued, and Adrar, were distinctly grouped into subcluster IIb (see Fig. 3 and Table 1). This subcluster is the most heterogeneous among those identified; it is closer to subcluster IIa than the first one over a distance of 104.18. Except Berrihane 1 and El Frin, all accessions of the second cluster were cultivated in the Saharan climate. Clustering of these accessions in the same group can be explained by their adaptation to the specific climate of the Sahara.

5. Analysis of gel electrophoresis

In peanut, main seed storage proteins (about 87%) are globulins comprising two major fractions: arachin and conarachin described by X. Q. Liang et al. (2006). Total proteins extracted from thirty peanut accessions were separated by one-dimensional SDS-PAGE (Table 5), and the protein profiles revealed a few major quantitative and qualitative differences (Fig. 4); total bands distributed in the range of 250–6 kDa were scored. Electrophoresis profiles showed that different peanut accessions had different storage protein compositions generating 8 different genotypes presented in Figure 4.

The evaluation of band density using the Image Lab software version 5.1 (Biorad) revealed few differences among the studied accessions (data not shown). Most of the bands, including 4a, 3b, 4b, 1c, 2c, 3c, 4c, 1d and 2d, presented variable density on the electrophoresis profile. This variation may be due to the adaptation of accessions to ecogeographic factors,

soil richness in fertilizer like nitrogen, and the agronomic practices of the region (Chowdhury et al., 2015).

The number of protein bands present in each accession ranged from 23 to 30 bands. On the basis of the Rf value, the bands were grouped into four regions: region A (conarachin II), region B (acidic arachin), region C (basic arachin), and region D (conarachin I). No major qualitative variations were observed among the studied accessions in the arachin polypeptides (from 20 kDa to 50 kDa). The second fraction of globulin, represented by conarachin polypeptides, was divided into two groups with different molecular weight (> 50 kDa for conarachin II, and < 20 kDa for conarachin I).

Regarding the electrophoresis profiles, the studied peanut accessions presented similar conarachin II profiles (region A), characterized by a major protein of 61 kDa; this band corresponds to one of the important peanut allergens (Arah1).

In the electrophoresis profiles, 7 bands were identified in the region D, among which the first and the second conarachin I protein subunits were highly polymorphic; they presented a molecular weight of 20.2 kDa and 17.72 kDa, respectively, for most of the accessions, unlike 6 accessions of the collection from Taref and El Oued (Lamaïssia 1, Lamaïssia 2, Kala 3, El Oued 2, El Oued 3, and Boubeïadha 2) which missed these subunits. On the other hand, nine accessions, including Chafia 1, Hiba 1, Sebseb 2, Metili, El Mansoura, and others (see Fig. 4), presented these subunits with lower molecular weights (18.4 and 17.4, respectively). The accession Kala 4 had a specific profile and presented only the higher subunit (20.2 kDa).

6. Relationships among the studied accessions tested using storage protein separation

Cluster analysis of the accessions sorted the peanut population into three main groups at the distance of 56.8 (Fig. 5). Cluster I incorporated five accessions originated from Taref and Adrar, representing 16.66% of the total studied population. The second cluster represented 30% of the population and included 9 accessions of two different origins, Taref and Ghardaïa.

Table 5. Protein profiling of *Arachis hypogaea* L. accessions
Таблица 5. Профилирование белков у образцов *Arachis hypogaea* L.

Band number	Band name	Region	Molecular weight (kDa)	Relative to front
1	nl1	NL	250.0	0.051
2	nl2		238.9	0.067
3	nl3		181.2	0.190
4	nl4		174.7	0.212
5	nl5		116.0	0.337
6	nl6		110.5	0.353
7	a1	A	103.4	0.362
8	a2		94.6	0.394
9	a3		85.7	0.425
10	a4		78.2	0.441
11	a5		68.1	0.476
12	a6		61.0	0.525
13	a7	B	57.2	0.542
14	b1		54.6	0.583
15	b2		50.3	0.610
16	b3		44.5	0.629
17	b4		43.2	0.648
18	b5		40.5	0.673
19	b6	C	37.2	0.702
20	c1		35.0	0.735
21	c2		32.4	0.771
22	c3		29.5	0.783
23	c4	D	28.0	0.799
24	d1		20.2	0.821
25	d2		18.4	0.839
			17.72	0.850
26	d3		17.40	0.841
			14.74	0.873
27	d4		13.42	0.881
28	d5	11.32	0.908	
29	d6	8.851	0.932	
30	d7	6	0.954	

Note: NI – non labelled

Примечание: NI – немаркированный

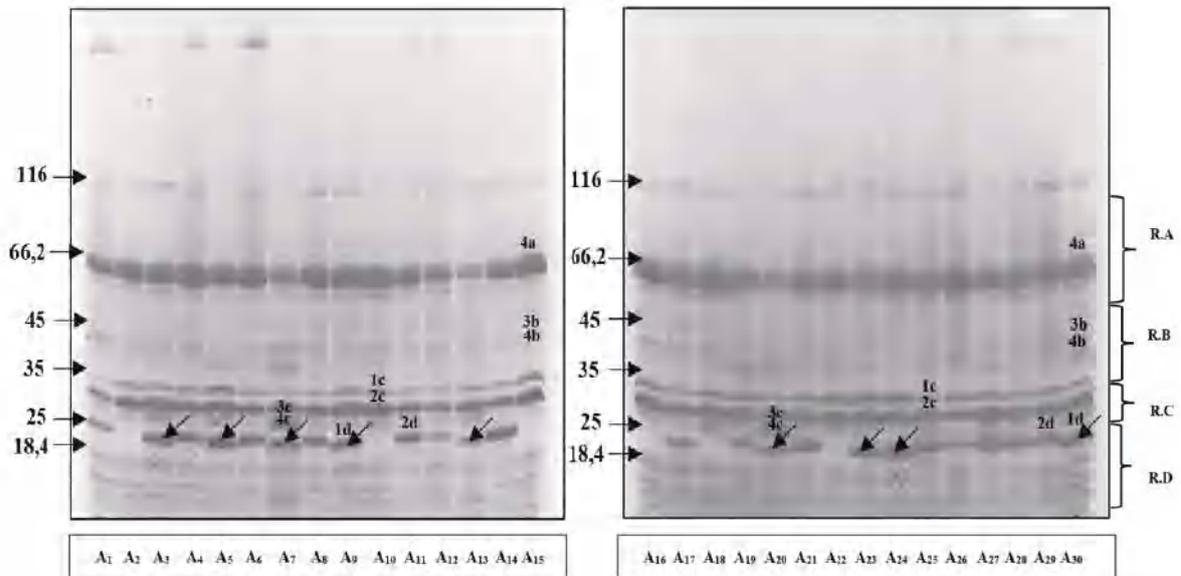


Fig. 4. Electrophoretic banding pattern generated by SDS-PAGE of *Arachis hypogaea* L. seed storage proteins:
 A1 – Berrihane 1, A2 – Lamaissia 1, A3 – Sebseb 2, A4 – Kala 1, A5 – Chafia 1, A6 – Boubeiadha 1, A7 – Hiba 1, A8 – Chafia 2, A9 – Hiba 2, A10 – Lamaissia 2, A11 – Adrar 1, A12 – Kala 2, A13 – Sebseb 1, A14 – El Oued 1, A15 – Kala 3, A16 – El Oued 2, A17 – Adrar 2, A18 – Boubeiadha 2, A19 – El Frin, A20 – El Oued 4, A21 – Boumalek, A22 – El Oued 3, A23 – Metlili, A24 – Sebseb 3, A25 – Berrihane 2, A26 – Kala 4, A27 – Oum T Boul, A28 – Tonga-ouest, A29 – Timimoune, A30 – El Mansoura, R.A – Region A, R.B – Region B, R.C – Region C, R.D – Region D, R.NL – Region non labelled

Рис. 4. Спектры электрофореза SDS-PAGE для запасных белков семян образцов *Arachis hypogaea* L.:
 A1 – Berrihane 1, A2 – Lamaissia 1, A3 – Sebseb 2, A4 – Kala 1, A5 – Chafia 1, A6 – Boubeiadha 1, A7 – Hiba 1, A8 – Chafia 2, A9 – Hiba 2, A10 – Lamaissia 2, A11 – Adrar 1, A12 – Kala 2, A13 – Sebseb 1, A14 – El Oued 1, A15 – Kala 3, A16 – El Oued 2, A17 – Adrar 2, A18 – Boubeiadha 2, A19 – El Frin, A20 – El Oued 4, A21 – Boumalek, A22 – El Oued 3, A23 – Metlili, A24 – Sebseb 3, A25 – Berrihane 2, A26 – Kala 4, A27 – Oum T Boul, A28 – Tonga-ouest, A29 – Timimoune, A30 – El Mansoura, R.A – область А, R.B – область В, R.C – область С, R.D – область D, R.NL – немаркированная область

Dendrogram

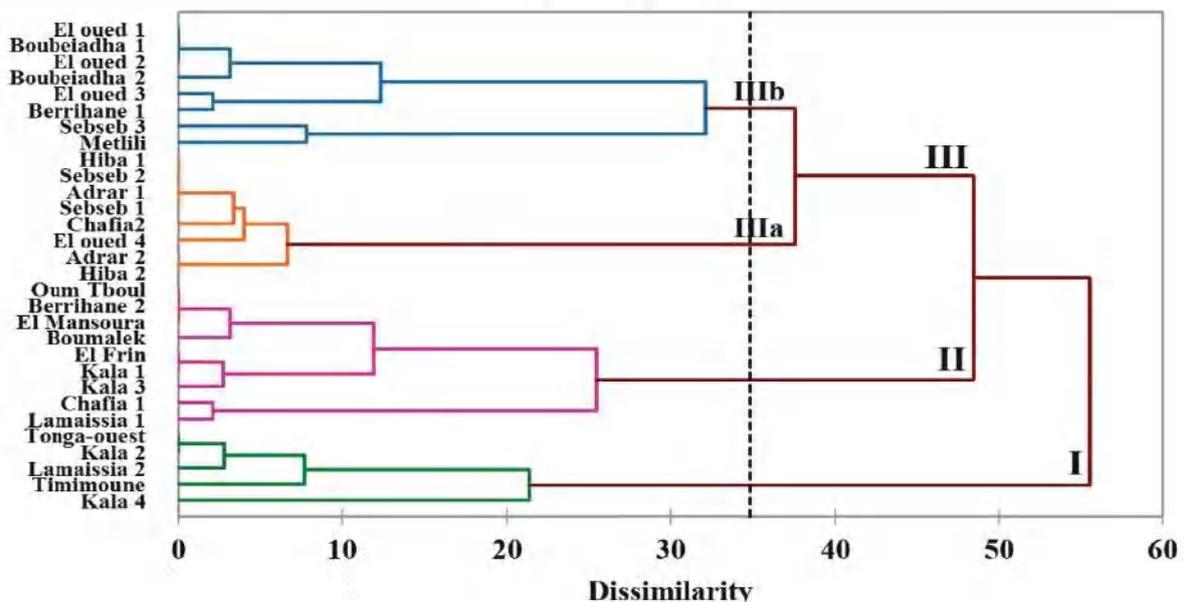


Fig. 5. Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on storage seed proteins

Рис. 5. Дендрограмма, построенная с использованием кластерного анализа UPGMA на основе запасных белков семян

The third cluster was composed of two subclusters (IIIa and IIIb). The first subcluster contained genotypes from different geographic regions: 8 accessions, including Hiba 2, Adrar 2, Chafia 2, Sebseb 1, and others. This subcluster described 26.66% of the whole population studied. Similarly, the second subcluster harbored 8 accessions of different geographic origin, like El Oued and Ghardaïa. These subclusters are the closest ones at a distance of 38.21 and were the most heterogeneous, harboring accessions of different origin. Many authors investigated seed storage proteins in the genus *Arachis* (Singh et al., 1991; Lianget et al., 2006). M. Jamalomidj et al. (2015) analyzed eleven accessions of peanut germplasm by SDS PAGE and showed that the diversity exists for seed storage protein profiles, but the germplasm was not well classified into subspecies or varieties. In contrast, an attempt was made to characterize 35 peanut cultivars raised by different pedigrees, using total soluble seed proteins separated by SDS-PAGE. Results showed a wide variation in the pattern of protein bands of the studied cultivars (Rao et al., 2013).

Discussion

To date, no study has assessed the variability of local peanut cultivars either at the morphological or at the molecular level. Hence, the current study is the first work where morphological characters were used to study the genetic diversity of *A. hypogaea* in Algeria. Diversity analysis using morphological characters is, therefore, very relevant for evaluation of genetic resources in the context of breeding programs.

The dendrogram describing the distances among accessions (see Fig. 2) revealed two distinguishable groups, clustering accessions originated from the coastal and Saharan regions. Generally, the studied Saharan accessions, including Ghardaïa, El Oued and Adrar, had high branching density and coarse texture of pod surface. This can be explained by the sunshine in the region and the type of sandy soil.

Branching in peanuts may produce a positive impact on yield, since the branches bear the leaves and also determine the solar radiation interception and utilization. In addition, the nodes of branches are potential sites for peg development and subsequent pod formation (Konlan et al., 2013). On the other hand, Saharan accessions, especially those of Ghardaïa, had the most significant height of main stems with the mean of 46.78 cm, compared with coastal accessions which were characterized by smaller stems (43.06 cm). These observations agree with those of G. S. Zhao et al. (2007), where soil texture was the major factor affecting bean growth; they found that plants in loam and sand were significantly larger than in clay (Lu et al., 2010).

Cylindrical seed shape was a specific trait of all Ghardaïa accessions; seeds and pods of these accessions were consequently the longest ones in the collection. This can increase the chance to get pods with many seeds and enhance the yield. In fact, the Ghardaïa and Adrar accessions more frequently contained 3 seeds in their pods than 2 seeds, unlike the Taref accessions which rarely had pods with 3 seeds. Knowing that soil texture is an important measure of potential soil productivity (Lu et al., 2010), Zhao and collaborators (2015) revealed that the number of seeds in peanuts was shown to be the largest in the loam, large in the sand, and the smallest in the clay.

Soil texture also affects the nodulation capacity of peanut. Indeed, sand soil was the poorest in organic matter, like phosphorus and nitrogen (Zhao et al., 2015). Therefore, peanut roots were able to form a nitrogen-fixing symbiosis with bacteria from the genus *Rhizobium* using nodules developed fre-

quently on sand soils (Chevalier, 1934). Due to the soil texture, most of the Saharan accessions developed nodules on their root system. In contrast, all accessions originated from Taref produced glabrous roots. Except El Oued 03, the accessions originated from El Oued Province showed the best agronomic traits, thus being capable of improving peanut production because of their large seed size.

The El Oued accessions were the richest in oil content with an average of 48.31%. In addition to that, these accessions mature in 80 to 100 days, and 50% of their flowers open between 20 to 45 days after sowing. These characteristics make the accessions that originated from El Oued Province the perfect target for producers due to their large seed size, short period of maturation, and high oil content.

According to A. Krapovickas and W. C. Gregory (1994), branching pattern and growth habit are the most distinguishing traits between *A. hypogaea* subspecies, such as *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* and *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* Waldron. In fact, subsp. *hypogaea* was characterized by an irregular branching pattern without flowers on the main stem and a procumbent growth habit. However, subsp. *fastigiata* was characterized by the absence of flowers on the main stem with an erect growth habit. Proceeding from the results shown on the graph, accessions of the collection can be divided into two groups: accessions of the coastal region belonging to subsp. *fastigiata*, and those of Saharan region belonging to subsp. *hypogaea*.

Judging by the results obtained by A. R. Singh et al. (2018), seed protein fractions can serve as an important marker to assess the variability among germplasm and also distinguish between the subspecies and varieties. These results support those of PCA and confirm the presence of the two subspecies of *A. hypogaea* in the studied collection. We deduce also that conarachin I protein subunits play a crucial role in the discrimination of *A. hypogaea* subspecies.

A high correlation was observed between the classification based on agro-morphological traits and the one based on storage proteins. In fact, the two classification criteria grouped the accessions originated from Taref and El Oued into distinct groups. However, a heterogeneous group was observed for the two classifications. Besides that, the characters used for both classifications can distinguish between the *A. hypogaea* subspecies. Nevertheless, it is suggested that the number of accessions should be increased for better understanding the genetic relationships.

Conclusion

Genetic improvement of crops depends on the availability of genetic resources and their diversity. We report here for the first time on the genetic diversity of the Algerian peanut population analyzed using agro-morphological traits. The results showed a high genetic variability regarding agro-morphological traits and seed storage proteins in the studied collection. This diversity could mainly be attributed to the diverse agroclimatic conditions in the country. Hence, the three groups defined on the dendrogram based on agro-morphological characters belonged to two *A. hypogaea* subspecies and may represent the required variability for a basic collection. Results also show that the accessions from El Oued presented the best agro-morphological traits and can be highly recommended for cultivation and production of peanut by-products. With the aim to create an efficiency improvement program for Algerian peanut accessions, it is necessary to support this work with a genetic study to discriminate characters of agronomic importance.

The authors are grateful to the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria, and the National Center for Biotechnology Research (CRBT) of Constantine.

Авторы благодарны Министерству высшего образования и научных исследований Алжира, Генеральному управлению научных исследований и технологического развития Алжира, Национальному центру биотехнологических исследований в г. Константин.

References / Литература

- Chevalier A. Monographie de l'Arachide (Suite). *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 1934;14(156):565-632. [in French] DOI: 10.3406/jatba.1934.5400
- Chowdhury F.N., Hossain D., Hosen M., Rahman S. Comparative study on chemical composition of five varieties of groundnut (*Arachis hypogaea*). *World Journal of Agricultural Sciences*. 2015;11(5):247-254. DOI: 10.5829/idosi.wjas.2015.11.5.1864
- Descriptors for Groundnut. Rome: IBPGR; Patancheru: ICRISAT; 1992.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and agriculture data. FAO; 2020. Available from: <http://faostat.fao.org/> [accessed Oct. 08, 2020].
- Giuffrè A.M., Tellah S., Capocasale M., Zappia C., Latati M., Badiani M. et al. Seed oil from ten Algerian peanut landraces for edible use and biodiesel production. *Journal of Olea Science*. 2016;65(1):9-20. DOI: 10.5650/jos.ess15199
- Idi Garba N.M., Bakasso Y., Atta S., Mamane M.I., Adamou M., Hamidou F. et al. Evaluation of agro-morphological diversity of ground nut (*Arachis hypogaea* L.) in Niger. *African Journal of Agricultural Research*. 2015;10(5):334-344. DOI: 10.5897/AJAR2013.8364
- Jamalomidi M., Gholami M., Fareneh J. Seed storage protein electrophoresis for identification of some groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 2015;9(10):1718-1721.
- Katzamanidis S.T., Stavropoulos N., Ipsilandis C.G. Classification and evaluation of Greek groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using 17 main agronomic and quality traits. *Pakistan Journal of Biological Science*. 2006;9(6):1021-1027. DOI: 10.3923/pjbs.2006.1021.1027
- Konlan S., Sarkodie-Addo J., Asare E., Kombiok M.J. Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varietal response to spacing in the Guinea Savanna agro-ecological zone of Ghana: Nodulation and nitrogen fixation. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 2013;4(3):324-335. DOI: 10.5251/abjna.2013.4.3.324.335
- Krapovickas A., Gregory W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*. 1994;8:1-186. [in Spanish]
- Kushwah A., Gupta S., Sharma S.R., Kaur K. Study on genetic diversity in groundnut [study on genetic diversity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using morphological markers. *Supplement on Genetics and Plant Breeding*. 2016;11(4):3105-3109.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. DOI: 10.1038/227680a0
- Liang X.Q., Luo M., Holbrook C.C., Guo B.Z. Storage protein profiles in Spanish and runner market type peanuts and potential markers. *BMC Plant Biology*. 2006;6(1):24. DOI: 10.1186/1471-2229-6-24
- Lu H.D., Xue J.Q., Ma G.S., Hao Y.C., Zhang R.H., Ma X.F. Soil physical and chemical properties and root distribution in high yielding spring maize fields in Yulin, Shaanxi Province. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 2010;21(4):895-900.
- Mahalakshmi P., Manivannan N., Muralidharan V. Genetic divergence of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm. *Legume Research - An International Journal*. 2005;28(3):220-222.
- Neya F.B., Koita K., Elise S., Zagre B.M.M., Nana A.T., Burow M.D. et al. Agro-morphological diversity of six peanut (*Arachis hypogaea* L.) breeding lines from three geographical areas. *Journal of Experimental Agriculture International*. 2017;19(5):1-12. DOI: 10.9734/jeai/2017/37686
- Rao P.S., Bharathi M., Reddy K.B. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties through chemical tests and electrophoresis of soluble seed proteins. *Legume Research*. 2013;36(6):475-483.
- Singh A., Raina S.N., Rajpal V.R., Singh A.K. Seed protein fraction electrophoresis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions and wild species. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2018;24(3):465-481. DOI: 10.1007/s12298-018-0521-8
- Singh A.K., Sivaramakrishnan S., Mengesha M.H., Ramiah C.D. Phylogenetic relations in section *Arachis* based on seed protein profile. *Theoretical and Applied Genetics*. 1991;82(5):593-597. DOI: 10.1007/BF00226795
- Yamada T., Aibara S., Morita Y. Accumulation pattern of arachin and its subunits in maturation of groundnut seeds. *Plant and Cell Physiology*. 1980;21(8):1217-1226. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076120
- Zaman M.A., Tuhina-Khatun M., Ullah M.Z., Moniruzzamn M., Alam K.H. Genetic variability and path analysis of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Agriculturists*. 2011;9(1-2):29-36. DOI: 10.3329/agric.v9i1-2.9476
- Zhao C.X., Jia L.H., Wang Y.F., Wang M.L., McGiffen Jr M.E. Effects of different soil texture on peanut growth and development. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2015;46(18):2249-2257. DOI: 10.1080/00103624.2015.1059845
- Zhao G.S., Li W.J., Sun Q. Effects of different soil texture on dry matter accumulation of Alfalfa. *Xinjiang Agricultural Sciences*. 2007;44(5):642-646.

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Джегхим Х., Беллил И., Кхелифи Д. Генетическое разнообразие алжирской популяции арахиса, изученной с использованием морфологических маркеров и запасных белков семян. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021;182(3):9-22. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-3-9-22

Djeghim H., Bellil I., Khelifi D. Genetic diversity of the Algerian peanut population analyzed using morphological markers and seed storage proteins. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2021;182(3):9-22. DOI: 10.30901/2227-8834-2021-3-9-22

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-9-22>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Авторы одобрили рукопись / The authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest

ORCID

Djeghim H. <https://orcid.org/0000-0001-7913-6346>

Bellil I. <https://orcid.org/0000-0003-2718-3102>

Khelifi D. <https://orcid.org/0000-0001-8139-5064>

Chapitre II

**Etude de la diversité génétique et
structuration d'une population d'arachide
algérien (*Arachis hypogaea*) par
microsatellite**

Préambule

L'arachide cultivé (*Arachis hypogaea*) est une espèce tétraploïde ($2n = 4x = 40$) avec une composition génomique de AABB ; il est considéré comme le fruit de l'hybridation naturelle de deux espèces sauvages diploïdes étroitement apparentées suivie soit d'une duplication chromosomique, soit d'une fusion de gamètes non réduits, aboutissant à un allotétraploïde avec deux ensembles de chromosomes de chacun des génomes parentaux constitutifs.

Cependant, malgré l'importance de cette culture sur le plan économique et nutritionnel, peu d'études ont été effectuées pour apprécier la diversité génétique et/ou proposer une cartographie chromosomique de cette espèce en utilisant des marqueurs moléculaires.

Dans ce deuxième chapitre, et pour la première fois en Algérie une synthèse sur la diversité génétique ainsi qu'une structuration d'une population composée de 68 accessions d'arachide récolté à travers le territoire national en utilisant 11 marqueurs moléculaires de type SSR publiée dans le journal **Plant Molecular Biology Reporter en 2021** est proposée. L'objectif de l'étude était de retracer l'origine des accessions étudiées par une structuration de la population et une identification des profils génétiques semblables. Les niveaux de diversité génétique des cultivars locaux d'arachide algérien qui permettent de caractériser et d'identifier les variétés algériennes d'arachide et de développer des variétés aux caractères agronomiques améliorés y sont présentés.

Un total de 83 allèles a été identifié dont 20 allèles rares et 5 allèles uniques. Ces résultats dévoilent un grand polymorphisme au sein de la population étudiée. Le traitement des données a permis également de répartir les individus de la population en deux grands groupes selon leurs origines. L'analyse des profils génétiques semblables par structuration a confirmé la présence de deux grands profils génétiques différents appartenant aux cultivars du nord et du sud.

Les résultats de cette étude peuvent être utilisés pour proposer une stratégie évolutive basée sur le croisement naturel dans le but d'améliorer la qualité agronomique des accessions et/ou de proposer un modèle variétal résistant au stress hydrique et aux agressions fongiques.

Article 2: First Records on Genetic Diversity and Population Structure of Algerian Peanut (*Arachis hypogaea*) Using Microsatellite Markers

Hanène Djeghim, Ines Bellil, Rima Hind Boudchicha, Ali Boumegoura,
Douadi Khelifi

Plant Molecular Biology Reporter 1-12. (2021)



First Records on Genetic Diversity and Population Structure of Algerian Peanut (*Arachis hypogaea*) Using Microsatellite Markers

Hanène Djeghim^{1,2} · Ines Bellil¹ · Rima Hind Boudchicha³ · Ali Boumegoura³ · Douadi Khelifi^{1,4}

Received: 4 March 2021 / Accepted: 2 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of the wide cultivated plants with a narrow genetic base, hence the interest in prospecting, rescuing, and characterizing germplasm of this species is continuously carried out. In this work, eleven microsatellite markers were used to assess the genetic diversity and population structure of 68 Algerian peanut accessions originated from four geographic regions in the north and south of Algeria. A total of 83 alleles were amplified with a mean number of 7.545 alleles per locus and polymorphic information content (PIC) ranged from 0.625 to 0.874. The observed and expected heterozygosity varied from 0.31 to 1.00 and from 0.61 to 0.84 with a mean of 0.704 and 0.732, respectively. Genetic structure analysis showed a strong population at $K=2$, separating accessions according to their subspecies affiliation (*hypogaea* ssp. and *fastigiata* ssp.). It was also able to quantify the genetic correlations between genotypes using principal component analysis (PCA) and the method of groups of unweighted pairings with arithmetic means (UPGMA). Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed high genetic variation within individuals (90.7%) and low genetic differentiation between subspecies (10.3%) and among populations (8.9%) from different geographical origin. Genetic diversity analysis in this study provides useful information for the exploration and utilization of these peanut cultivars.

Keywords Groundnut · Accessions · Polymorphism · SSR · Algeria

Key Message

- Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of the most important groundnuts cultivated worldwide. A good organization and conservation of local cultivars involve a prior genetic assessment of the variability presented in germplasm collections. This paper reports for the first time a study of genetic diversity and phylogenetic analysis of Algerian peanut cultivars using microsatellite markers.

✉ Ines Bellil
bines07@yahoo.fr

¹ Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25000 Constantine, Algeria

² Laboratoire de Biochimie, Division de Biotechnologie et Santé, Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), 25000 Constantine, Algeria

³ Laboratoire de Biologie Moléculaire, Division de Biotechnologie et Agriculture, Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), 25000 Constantine, Algeria

⁴ Ecole Nationale Supérieure De Biotechnologie (ENSB), 25000 Constantine, Algeria

Introduction

Peanut or groundnut is an economically important oilseed widely cultivated in tropical and subtropical regions of the world for their oil richest and protein quality. Algeria is one of the African produced countries; in 2018, a crop of 118,9000 tonnes were recorded over an area of 475,000 hectares distributed among several provinces as El Taref, Ghardaïa, El Oued, and Adrar (FAOSTAT 2018). The genus *Arachis* based on morphological, geographical distribution, and cross-compatibility has been divided into nine taxonomic sections and comprises 80 described species (Krapovickas and Gregory 1994; Valls and Simpson 2005), which includes both diploids and tetraploids belonging to either annual or perennial type. Among them, *A. hypogaea* L. is the only cultivated and the most studied species. It is an allotetraploid ($2n=4x=40$) with a genomic composition of AABB; it is considered having originated from natural hybridization of two closely related diploid wild species followed by either chromosome duplication or fusion of unreduced gametes, resulting in an allotetraploid with two sets of chromosomes of each of the constituent

parental genomes (Seijo et al. 2004, 2007). Cultivated peanut is divided into two subspecies distinguished by two types of growth habit with subsp. *fastigiata* possessing flowers on the main stem and a sequential branching pattern whereas subsp. *hypogaea* lacks flowers on the main stem and exhibits alternate branching pattern (Krapovickas et al. 2007).

Hybridization between selected parents, selection using phenotyping, and advancing the generations, followed by yield trials have led to the development and release of several varieties suitable to varying production environments and meet the needs of the producers, consumers, and industry (Pasupuleti and Nigam 2013). However, even though peanut is an important crop economically and nutritionally, narrow genetic diversity and a deficiency of polymorphic DNA markers in the public database have hindered genetic mapping and the application of molecular breeding in cultivated peanut by using traditional markers such as RAPD and RFLP (Hong et al. 2010). Nevertheless, microsatellites show higher levels of polymorphism than other genetic markers (Rafalski et al. 1996). The origin of such polymorphism is still under debate, though it appears most likely to be due to slippage events during DNA replication (Schlötterer and Tautz 1992). The high informative content because of high polymorphism, co-dominance, and rapid analysis by PCR make microsatellites well poised for exploitation in plant breeding applications such as linkage analysis, agronomic trait selection, germplasm assessment, and varietal identification.

To date, no work has been reported to assess the genetic diversity of Algerian local peanut accessions. In the present study, the genetic diversity of 68 accessions of peanut collected from 30 sites and produced on three different geographic zones (Coastal, North Sahara, and Central Sahara) of Algeria was analysed using 11 SSR markers. Our aim was to estimate the levels of genetic diversity of local Algerian peanut (*A. hypogaea*) cultivars. Thus, these results help to characterize and identify Algerian peanut varieties and to develop variety with improved agronomic traits.

Material and Methods

Plant Material

A collection of thirty peanut accessions were used in the present work as the starting plant material (Table 1). These accessions were grown under different bioclimatic conditions over four Algerian provinces including Taref, Ghardaïa, El Oued, and Adrar (Fig. 1). Seeds of the collection were sown on a commercial substrate (Plantaflor®) using three pots per accession under greenhouse conditions

on the Biotechnology Research Center of Constantine, Algeria (36°24.75' N, 6°57.05'E and 773 m above sea level). During the 7 months of growth, plants were irrigated as needed using tap water.

Total genomic DNA was isolated from all genotypes, especially those presented phenotypic differences and belonging to the same region of the collection in order to assess the inter-varietal diversity.

DNA Extraction

Total genomic DNA was isolated from fresh leaf tissue of groundnut genotypes at 30 days after sowing using CTAB method as described by Doyle and Doyle 1990 with some modifications. The quality and quantity of DNA samples extracted were evaluated on a 0.8% agarose gel electrophoresis and using a Nanodrop (NanoDrop™ 8000, ThermoFisher Scientific); thereafter, samples were diluted at the same concentration before processing of the PCR.

PCR Amplification and Detection of Polymorphisms

In the present study, 11 microsatellite loci were used to characterize the genetic variability of Algerian peanut accessions. These markers were chosen among the SSRs developed in previous works regarding their high polymorphism and high amplification quality. PCR reactions were performed in 25 µl volume contained 1× Go Taq buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, and 0.04 U of Go Taq DNA polymerase (Promega, Madison, USA). A total of 2 µl of DNA extracted were added in each PCR tube. Finally, the volume was completed to 25 µl with sterile ultra-pure water.

SSR amplification was occurred in a thermal cycler (BIO-RAD C1000, USA), and the reaction was carried out under the following temperature conditions: 95 °C for 5 min with 35 cycles of 95 °C for 60 s, 57–65 °C (depending upon annealing temperature of respective primer pair) for 60 s, 72 °C for 60 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. The success of the PCR reactions was checked on an agarose gel 1.2% before the identification of amplicons length sizes on capillary electrophoresis and non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Non-denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PAGE is a technique that makes possible to separate DNA fragments even with a small length difference used, especially to analyse microsatellite markers as reported by Morgante and Olivieri 1993.

A total of 10 µl of PCR products were placed on each well after a pre-run of the polyacrylamide gels for 30 min. The running conditions were 300 V, 40 mA using TBE X1

Table 1 Geographic origin of the Algerian peanut (*A. hypogaea*) accessions investigated

Geographic origin	Region of the collection/location	Sites of collection	Number of accessions	Geographic zone	Bioclimatic floor
Taref	Berrihane, El Kala	Berrihane 1	1	Coastal	Subhumid
		Berrihane 2	2		
	Lamaissia, El Kala	Lamaissia 1	2		
		Lamaissia 2	2		
	Chefia, El Kala	Chefia 1	2		
		Chefia 2	2		
	El Kala	Kala 1	1		
		Kala 2	3		
		Kala 3	3		
		Kala 4	1		
	El Frin, El Kala	El Frin	2		
	Boumalek, El Kala	Boumalek	2		
	Oum Tboul, El Kala	Oum Tboul	2		
	Tonga-Ouest, El Kala	Tonga-ouest	3		
	Ghardaïa	Sebseb	Sebseb 1		
Sebseb 2			2		
Sebseb 3			2		
El Mansoura		El Mansoura	2		
Metlili		Metlili	3		
Oued-souf	Boubeiadha, Taghzout	Boubeiadha 1	4		
		Boubeiadha 2	4		
	Guemar	El Oued 1	4		
	Bagouza, Taghzout	El Oued 2	1		
	El Oued	El Oued 3	2		
El Oued 4		4			
Adrar	Charouine	Hiba 1	1	Central Sahara	
		Hiba 2	3		
	Ajdir, Timimoune	Adrar 1	1		
	Talmine, Timimoune	Adrar 2	3		
	Timimoune	Timimoune	2		

as migration buffer. SSR products were visualized through silver staining according to the steps indicated by Benbouza et al. (2006). The size of fragments was estimated based on pUC19 (Sau3A I Digest) ladder from Invitrogen (Invitrogen, USA).

Capillary Electrophoresis (ABI 3500XL Genetic Analyzer)

One microlitre of the PCR products and ladder (GeneScan600 LIZ standard, Applied Biosystems) were mixed with 1 µl of formamide in each well of PCR microplate; after denaturation at 95 °C for 5 min, products were analysed by capillary electrophoresis (ABI 3500XL Genetic Analyzer Applied Biosystems) and the GeneMapper Software v5 (Applied Biosystems) was used to allele sizing.

Data Analysis

Considering the tetraploid nature of *A. hypogaea*, the Polysat package (Clark and Drauch Schreier 2017) was used to transform the genotypic data into GenoDive (Meirmans 2020) and STRUCTURE files (Pritchard et al. 2000). Among the Genetic indices calculated by GenoDive, the genetic diversity per locus and population was evaluated by the following parameters: number of different alleles (Na), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), corrected fixation index ($G'st$ (Nei 1987)) and inbreeding coefficient (Gis). Analysis of molecular variance (AMOVA) was also identified using GenoDive in order to investigate genetic variation among and within populations using 10,000 permutations. The genetic distance between populations was calculated using Nei's genetic distance between populations implemented in

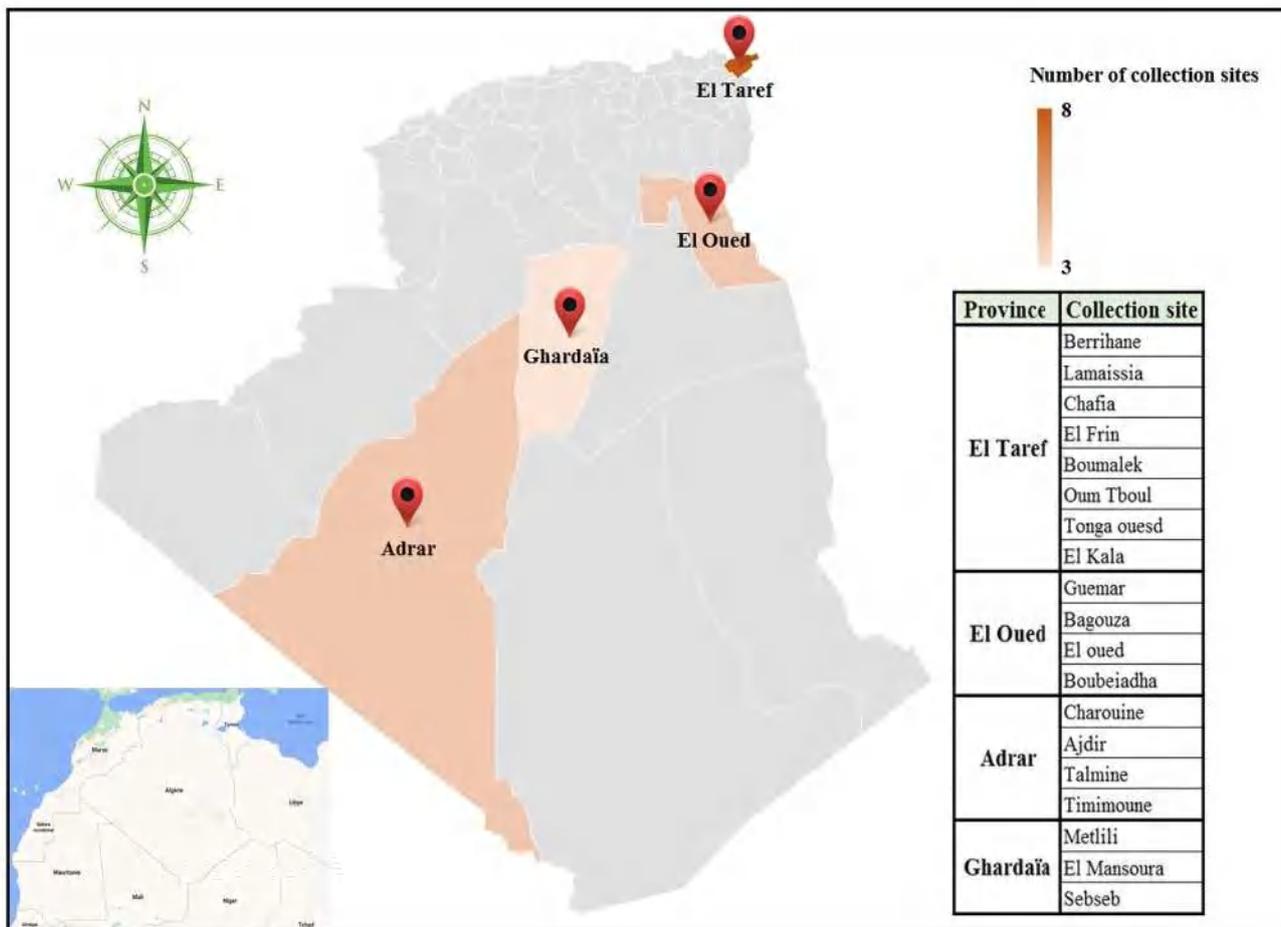


Fig. 1 Distribution of sampling locations for genetic study of *Arachis hypogaea*

GenoDive. The PIC ‘polymorphic Information Content’ was calculated according to Botstein et al. (1980) formula as follows:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2 P_i^2 P_j^2$$

where P_i and P_j are the frequencies of i th and j th alleles.

Binary matrix based on polymorphic SSR patterns was generated for each locus. The amplified fragments were scored as present or absent. In order to assess the relationship between the local peanut cultivars, the proportion of shared amplification fragments was used to obtain a similarity matrix based on the Simple Match (SM) which then used to construct the unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) tree using the NTSYS-pc 2.11 software (Rohlf 1997). Bootstrap support values were obtained from 1000 replicates using TREECON1.3b (Van De Peer and De Wachter 1994). Multivariate relationship among 68 accessions of peanut was established by the principal component analysis (PCA) using NTSYS-pc 2.11 software. Accessions were

projected along the first three principal axes to visualize genetic affinities.

Population genetic structure was analyzed based on Bayesian clustering using STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). For cluster values from $K=1$ to $K=10$, an admixture ancestry model and correlated allele frequency model were used to perform a Markov chain Monte Carlo simulation algorithm (MCMC). The length of the burn-in period was set to 10,000; MCMC after the burn-in period was set to 100,000, and for each K value, the calculation was repeated 10 times. Evanno et al. (2005) algorithm was calculated to determine the optimum number of K value using the software STRUCTURE harvester (Earl and vonholdt 2012). Accessions with membership proportions (Q -value) $> 70\%$ were considered as pure and part of their corresponding cluster, while accessions with membership proportions lesser than 70% were adjudged as admixtures. To minimize the variance across all the replicates of the selected K value, the computer program CLUMPP version 1.1 (Jakobsson and Rosenberg 2007) was used to generate a single Q matrix file for visualization with an online interface program called STRUCTURE PLOT (Ramasamy et al. 2014).

Table 2 Locus name, repeat motifs and citations, range size of amplified fragments, and genetic parameters in the Algerian Peanut collection analyzed

Markers	Sequences	Citations	Range size bp	N	He	Ho	Gis	PIC value	NR	UA
Lec1	CAAGCATCAACAACAACGA	Hopkins et al. (1999)	229–294	9	0.793	0.645	0.187	0.750	4	1
TC1E01	CAATGGAGGCAATCAAGT	Hopkins et al. (1999)	224–258	8	0.818	0.541	0.338	0.760	1	/
PM3	GAGAGCGAAAGAGAACGAGAC	Tang Wang et al. (2007)	194–283	13	0.842	1.000	-0.188	0.874	6	/
S-90	CAAAGTTTGCAGTGAATTTGTTG	Li et al. (2011)	130–166	4	0.617	0.667	-0.081	0.654	/	/
Ah3	TGGAATCTAATTGCTCATCGGCTCTG	Hopkins et al. (1999)	188–216	7	0.738	0.662	0.103	0.764	1	/
Ah4-26	GAAAGAAATTATACACTCCAATTATGC	He et al. (2003)	151–205	10	0.751	0.662	0.119	0.802	4	2
TC3H07	GGCGGCGAATGTAGAACCCCTCCAGTAG	Tang Wang et al. (2007)	242–268	6	0.663	0.313	0.528	0.625	1	1
TC11A04	GGAGGAGGACGACGATGATA	Ferguson et al. (2005)	168–197	8	0.765	0.982	-0.284	0.823	1	1
S-31	ACTCTGCATGGATGGCTACAG	Moretzsohn et al. (2005)	160–172	7	0.644	0.648	-0.006	0.784	2	0
Seq13E09	TCGGAGAACAAGCACACATC	Giunehes et al. (2007)	270–296	5	0.723	0.973	-0.346	0.679	/	/
GA35	CAGCAAAGAGTCCGTCAAGTCG	Moretzsohn et al. (2005)	177–206	6	0.698	0.646	0.075	0.722	/	/
Mean				7.545	0.732	0.704	0.039	0.749		

N number of alleles, He expected heterozygosity, Ho observed heterozygosity, Gis inbreeding coefficient, PIC polymorphic information content, NR number of rare alleles, UA number of unique alleles

Results

SSR Polymorphisms and Genetic Diversity

A total of 83 alleles were scored among the 11 loci used in this study ranging from four alleles for S-90 locus (130–166 bp) to 13 for the locus PM3 (194–283 bp) with an average of 7.545 per locus. Allele frequencies varied from 0.005 (for the allele 192 bp at the locus TC11A04) to 0.419 (for the alleles 137 bp and 159 bp at the locus S-90). Gene diversity and the polymorphic Information Content PIC per locus computed are shown in Table 2. Overall gene diversity (He) was high (0.732), and the overall observed heterozygosity (Ho) was also high (0.704). The mean values of the inbreeding coefficient (Gis) ranged from -0.346 to 0.528 with the mean 0.039, the negative values indicate a deficit of homozygotes, whereas the values of the inbreeding coefficient per population were closer to zero indicating a balance between the homozygotes and heterozygotes within population, as opposed to a population ‘El Oued’ characterized by an excess of heterozygotes (Table 3). The markers used here were highly informative. In fact, the PIC values of each locus ranged from 0.625 to 0.874 with an average of 0.749 per locus. The most informative marker was PM3 followed by the Ah4-26 and Lec1 loci, while the less informative was TC3H07 locus.

A total of 20 (22.61%) rare alleles were observed at 8 SSRs loci. The number of rare alleles detected at each locus is presented in Table 2. The number of rare alleles ranged from 1 (TC1E01 and Ah3) to 6 (PM3). In total, 5 unique alleles among the 20 rare alleles were detected at 4 SSR loci (Lec1, Ah4-26, TC3H07, and TC11A04) across all 68 peanut accessions analysed (Table 2). Two of them are founded only in cultivars ‘Tonga Ouest 3’ (174 bp and 201 bp at the same locus Ah4-26). In addition, among the 83 amplified alleles, 13 solely characterized specific populations and are distributed as follows: six alleles (Lec1-282 bp, Ah3-188 bp, Ah4-26–174 bp-201 bp, TC3H07-262 bp, TC11A04-192 bp) were amplified only in population ‘El Taref’ originated from the north; five (Lec1-246 bp, PM3-245 bp-262 bp-274 bp, Ah3-195 bp)

Table 3 Population genetic indices for the 11 microsatellite loci

Population	N	Ho	He	Gis
El Taref	6.273	0.700	0.741	0.055
Ghardaïa	4.364	0.695	0.705	0.015
El Oued	5.455	0.708	0.704	-0.005
Adrar	5.727	0.712	0.780	0.087

N number of alleles, He expected heterozygosity, Ho observed heterozygosity, Gis inbreeding coefficient

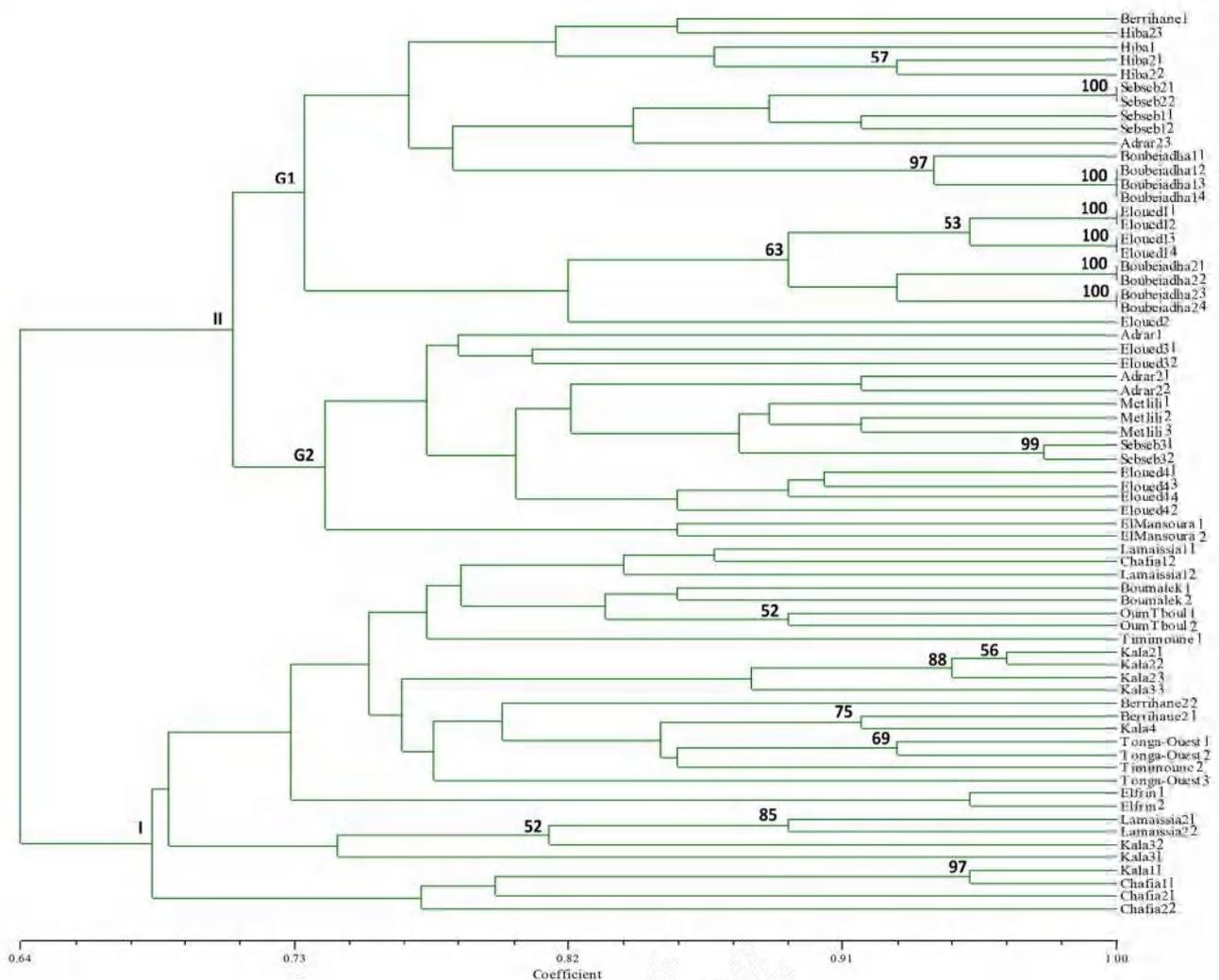


Fig. 2 UPGMA dendrogram based on SM similarity coefficient representing the relationships among Algerian Peanut cultivars

and two (S31-170 bp-172 bp) alleles were founded only in populations situated in the South 'El Oued' and 'Adrar', respectively.

Similarity and Genetic Relationships

Genetic similarities among accessions were estimated on the basis of simple match's (SM) similarity. A UPGMA dendrogram was constructed for all the 68 accessions (Fig. 2), and two clusters were clearly distinguished (I, II). The cluster I includes mainly individuals from 'El Taref' population with exception for two accessions 'Timimoune 1' and 'Timimoune 2' belonging to 'Adrar' population. The second cluster II contains the accession originated from the South region and could be divided into two sub groups (G1 and G2). The group (G1) includes accessions from 'Ghardaïa', 'El Oued', and 'Adrar' populations with one accession 'Berrihane 1' from 'El Taref' population. Some accessions from the same cultivars are clustered in

small groups like, the cultivars 'Boubeiadha 1, 2' and 'El Oued 1'. The second sub group (G2) contains also accessions from the three different populations from the South. Some accessions from the same cultivars are clustered in small groups (100% bootstrap) like the cultivars 'Boubeiadha 1, 2' and 'El Oued 1'. The similarity value among the cultivars ranged from 0.476 (between 'El Oued 2' and 'Timimoune 1') to 0.964 (between 'Kala21', 'Kala22', and 'Kala23') (data not shown).

The largest genetic distance was between population El Taref and Ghardaïa (0.109). The populations originated from the south showed a low genetic distance and seemed to be genetically close (0.016, 0.032, 0.055) (Table 4).

Population Structure

To assess genetic population structure of the 68 Algerian peanut accessions, STRUCTURE analysis was performed using the 11 SSR markers. Using the method of Evanno et al. (2005) maximal ΔK occurred at $K=2$ (Fig. 3) with

another small peak at $K = 8$. Obviously, the Bayesian analysis indicated that the 68 Algerian peanuts could be divided in two clusters (C1 and C2) according to their sub-varieties. The first cluster (C1) grouped 39 accessions originated mainly from the south region (Ghardaïa, El Oued and Adrar) with one accession 'Berrihane 1' from 'El Taref' (North region), while the second cluster (C2) contained 29 accessions from the population El Taref with two accessions from the population of Adrar (Timimoune 1 and 2, south region).

To affirm whether there is a genetic structure within South populations, sub-clustering analyses were performed. The results indicated that the high level of K was around 3 clustering the 3 populations from the south in three genetic pools. First, population of Ghardaïa is constituted from two clusters (SC1 and SC2), whereas El Oued population is presented by SC1, SC2, and SC3 clusters. Finally, population of Adrar is divided in two main cluster SC1 and SC2. Some accessions displayed a mixture of gene pools: Sebseb11, Sebseb12, ElOued2, ElOued41, El Oued44, Hiba23, Adrar21, Adrar22, and Adrar23 (Fig. 4).

Similarly, the PCA analysis showed that the 68 accessions were divided in two main groups according to their geographic origin (north and south) with exception for the three accessions 'Berrihane 1 and Timimoune 1 and 2'. In addition, the accessions from the south region are separated in two sub groups such as UPGMA analysis. The three first components explained 39.71% of the total variability and

Table 4 Values of Nei's G_{ST} for all pairs of populations

	El Taref	Ghardaïa	El Oued	Adrar
El Taref	–			
Ghardaïa	0.109	–		
El Oued	0.102	0.055	–	
Adrar	0.039	0.016	0.032	–

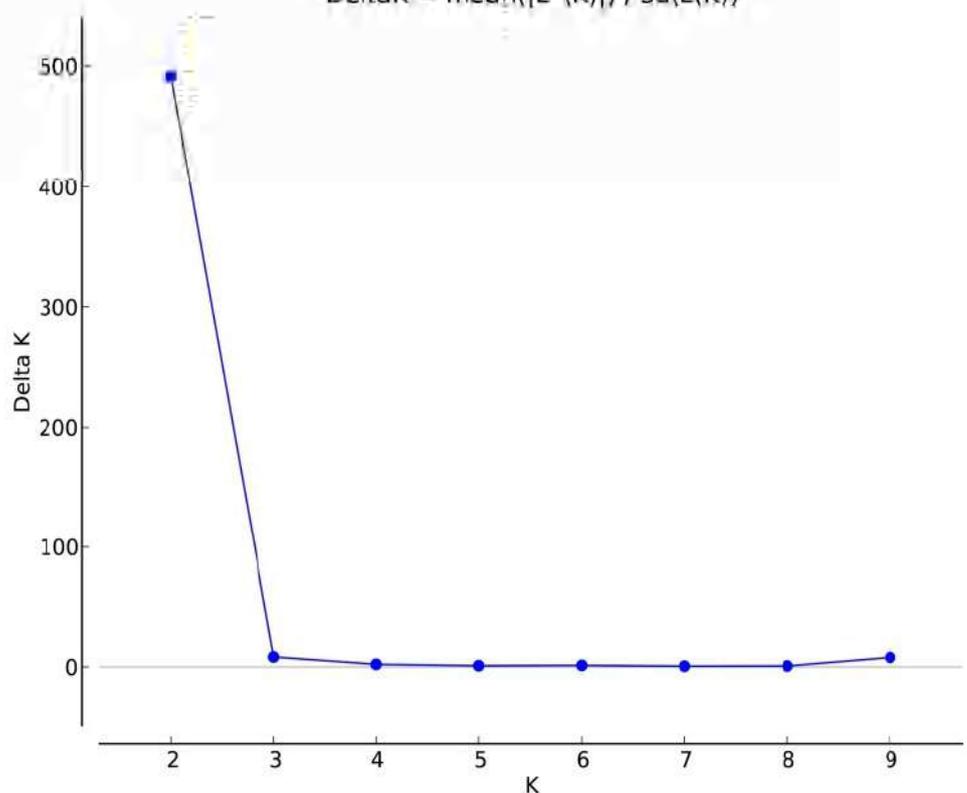
contributed, separately, with 18.94% (PC1), 11.22% (PC2), and 9.54% (PC3), respectively (Fig. 5).

The results of the AMOVA analysis showed that the genetic variability was explained by difference within individuals (90.7%), whereas 8.9% of the variability were distributed among population according to their geographical location. This result was in accordance with the G_{ST} (Nei)=0.06. Both results indicated that the genetic variation in local peanut accessions mainly occurs within populations.

Discussion

Genetic diversity in local peanut accessions did not make the subject of intensive studies in Algeria. The name of cultivars is mainly based on the location origin and contributes to misidentification of the subspecies. Hence, this work represents the first genetic assessment of local diversity of peanut

Fig. 3 The second-order rate change for K ranging from 1 to 10 (Delta K)



$$\text{Delta}K = \text{mean}(|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$$

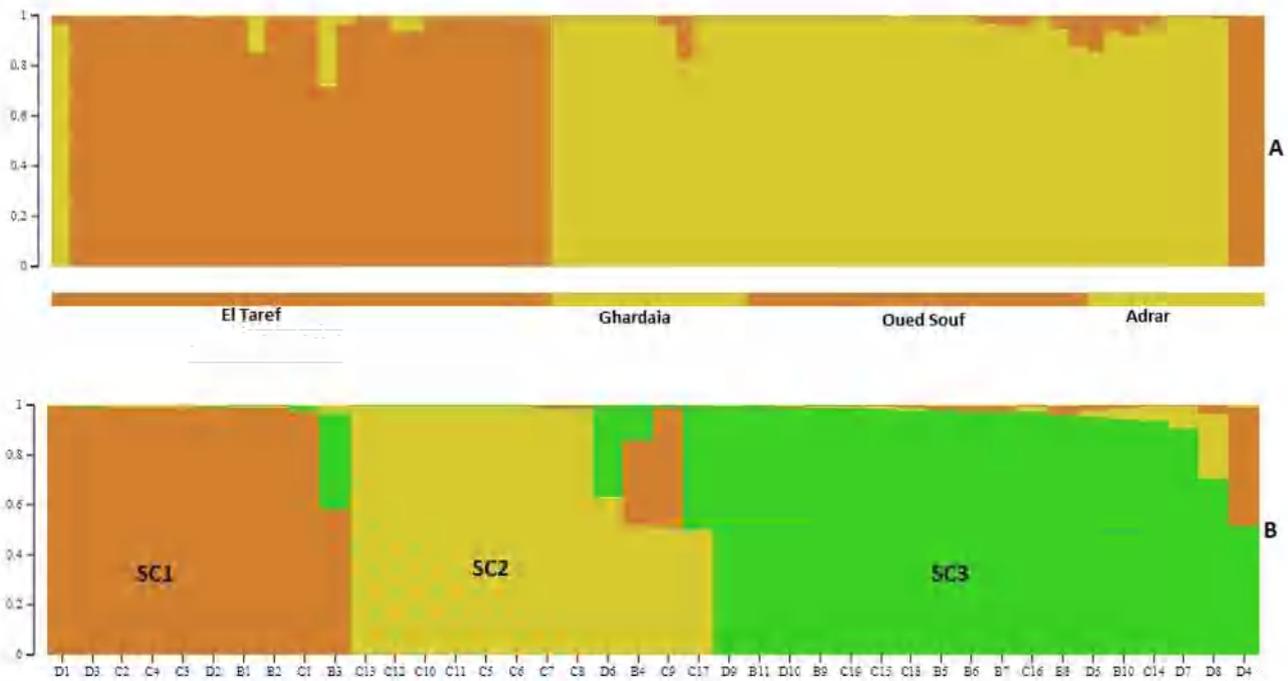


Fig. 4 **A** Bayesian clustering analysis based on 11 SSR marker data for Algerian Peanut populations performed using STRUCTURE at $K=2$. Each individual is represented by a single vertical bar. **B**

Bayesian sub-clustering analysis for the south region of the Algerian peanut performed with STRUCTURE at $K=3$

cultivars. Cultivated peanut has a limited genetic diversity within the peanut primary gene pool because of its tetraploid nature (AABB genome) (Pandey et al. 2012). Thus, this study performed SSR data analysis in *A. hypogaea* utilizing the polyploid analysis software Polysat and Genodive combined with NTSYS and STRUCTURE software. Actually, it is difficult to precisely identify the genotype of a tetraploid individual amplifying two or three alleles. For example, if the genotype was AB, then the individual genotype could not be distinguished from ABBB, AABB, and AAAB. Thus, the population genetic diversity could be presumably underestimated (Clark and Jasieniuk 2011 in Guo et al. 2019).

The indices of genetic diversity obtained in the present work were high ($H_e=0.732$ and $PIC=0.749$) in comparison to previous studies where a greater number of markers and accessions have been used. For instance, Wang et al. (2016) reported an overall H_e of 0.48 and overall PIC of 0.429 in different beading lines of peanuts from China, India, and USA by 111 SSRs. Similarly, Ren et al. 2014 recorded a value 0.11 of gene diversity (H_e) and a PIC of 0.38 in analyzing 196 peanut accessions planted in different regions of China using 146 SSRs. The analysis of a mini-core collection of peanut by Wang et al. 2011 showed a H_e of 0.59 and a PIC of 0.53. Varshney et al. 2009 analyzed 189 groundnuts representing 29 countries and 10 geographical regions using 25 SSRs and obtained a mean PIC of 0.70. Barkley et al. (2007) registered a $PIC=0.687$ when using 31 SSR markers on a mini core collection of

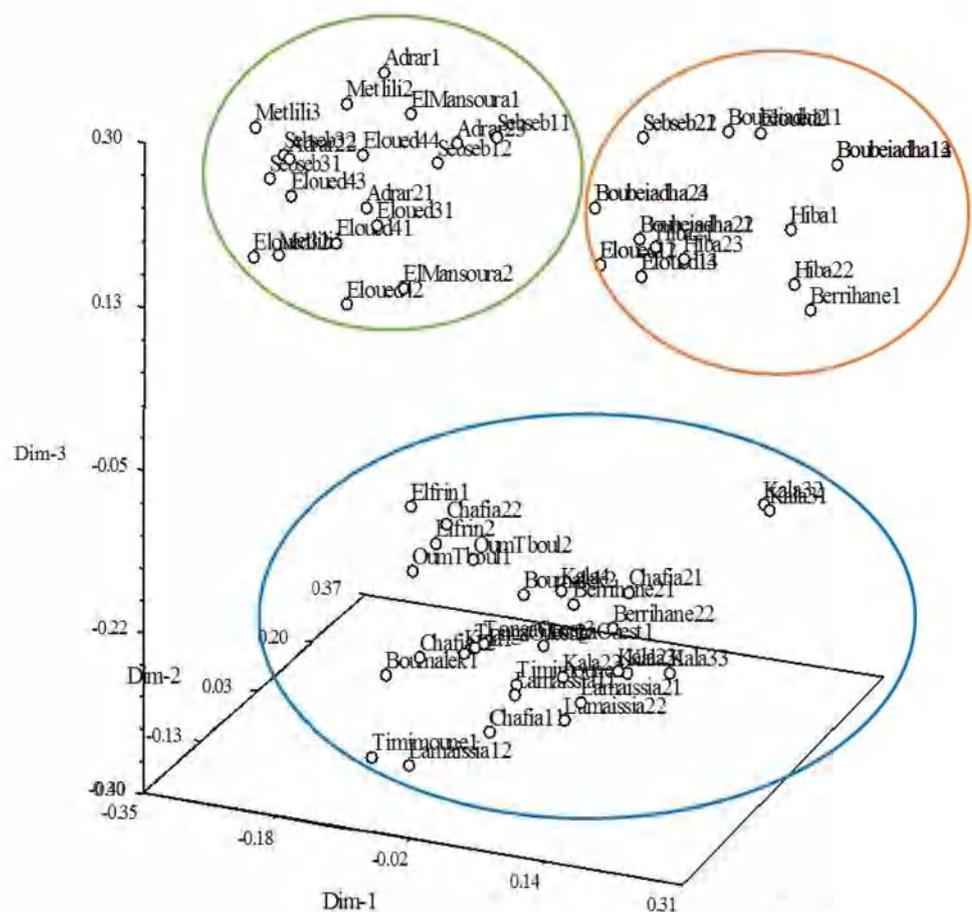
USA. The number of alleles per locus in this work was ($N=7.54$). Varshney et al. (2009), Wang et al. (2011), and Barkley et al. (2007) found that the number of alleles per locus was higher (10.6, 8.1, and 15.4), respectively. The high level of diversity reported in the present study may be attributed to the high informativeness of the chosen markers. Indeed, Varshney et al. (2009) reported that the polymorphic SSR markers and the diversity of the studied genotypes (different geographical regions, botanical types, and the biological status) increase level of genetic diversity.

The number of rare and unique alleles scored in local cultivars (20 rare, 5 unique) were less abundant than those reported by Ren et al. (2014) and Wang et al. (2016) (86 rare alleles at 66 loci and 127 rare alleles among them 59 were unique to a genotype, respectively); this could mainly due to the use of a lower number of accessions in this study (68 individuals).

High rate mutation at SSR loci could also explain the presence of many rare alleles (Henderson and Petes 1992). Often, unique alleles could indicate the presence of particular genotypes in a population and thus, might be an indicator of potential accessions with interesting traits suitable for crop improvement (Boudchicha et al. 2018).

At population level, inbreeding coefficient is negative for 'El Qued' population although it presents a value close to zero for remaining populations indicating that the accessions of Algerian peanut are not subjected to intensive inbreeding.

Fig. 5 The principal components analysis (PCA) of 11 SSR marker data of the 68 Algerian peanut accessions



probably due to the widespread cultivation of a vegetatively propagated cultivars.

Some of rare allele are specific to one population and then can be used to distinguish between them. For instance, the allele 282 bp (Lec1) amplified only in El Taref population, though, the allele 283 bp of the locus PM3 did not amplify in El Taref population and amplified in the three others. Among the 20 rare alleles, 5 unique alleles distinguished 4 genotypes (Boumalek2, Tonga Ouest3, Kala32, and Lamaissia12). Occurrence of both rare and unique alleles in a given genotype indicates the diverse nature of the genotype and thus may be useful for introducing the diversity in the applied breeding programmes (Varshney et al. 2009).

The UPGMA analysis allowed discriminating 61 genotypes from 68 accessions of peanut. Some accessions displayed the same genetic structure (with similarity coefficient = 1) and thus are considered as the same genotype, for example, Sebseb21 and Sebseb22, as they are progenitors from the same donor.

The UPGMA tree showed that the 68 accessions of Algerian peanut were divided in two main clusters (I and II) a priori according to their geographical origin: El Taref from the north region and Ghardaïa, El Oued and Adrar from the south region, with some exception (Berrihane 1,

Timimoune 1, and Timimoune 2). Comparing this results with the morphological characterization of the studied cultivars (data not shown), same results were observed; the cultivars (Berrihane and Timimoune) were clustered not according to their geographical origin but depending on their morphological aspect suggesting that the cultivars from the South region (Ghardaïa, El Oued and Adrar) with the cultivar Berrihane1 belong to the ssp. *Fastigiata*, whereas the cultivars from the North (El Taref) with the cultivars Timimoune 1 and Timimoune 2 belong to the ssp. *hypogaea*. This conclusion is supported by the fact that both of the accessions from the cultivars Berrihane (Berrihane 1 and Berrihane 2) are clearly different at morphological and molecular level and constituted therefore a case of homonymy. Actually, they represent two different subspecies of *A. hypogaea* cultivated in the same growing region.

The genetic distance (Gst, Nei 1987) between populations showed that the populations from the South are very close to each other and different from the population of the North 'El Taref'. This later is close to the population of Adrar, mostly because of the presence of the accessions Timimoune 1 and Timimoune 2 which share the genetic structure of the accessions from El Taref in addition to the small number of accessions sampled in this population (10 accessions). Overall,

the genetic distance value between populations is small and reflects genetic similarity among populations.

Comparable results were found in previous studies. Ren et al. (2014) founded that 196 Chinese peanut were divided in three ecological regions where sub species are grouped in a specific region. Mace et al. (2007) also noticed some degree of clustering of accessions from similar geographic origins within subspecies. Besides, in the study of Varshney et al. (2009), the tree dendrogram showed that there was no significant grouping of genotypes according to their geographical origin and concluded that the germplasm was divided as the subspecies affiliation.

The results obtained by the UPGMA clustering were coherent with those obtained by the PCA and STRUCTURE analysis. Indeed, PCA distinguished three groups; the groups A and B are similar to G1 and G2 in the UPGMA phenogram.

The Bayesian analysis has been used widely in order to identify any hierarchical clustering in a population. In this work, the best K value is 2, comforting the results founded by UPGMA clustering and PCA grouping. The accession identified by STRUCTURE matched those obtained by analysis with UPGMA and PCA and grouped the accession according to the subspecies. The membership of 29 individuals for cluster C1 is ≥ 0.7 , while the remaining accessions (39) have a membership coefficient ≥ 0.8 for the second cluster (C2). Clusters generated by the Bayesian approach are identical to the UPGMA and PCA groups where accession 'Berrihane1' is classified with South populations and the accessions 'Timimoune 1' and 'Timimoune 2' are grouped with the accessions from the North region.

The subclustering was performed in order to not underestimate the hierarchical subdivision of the south region using the same conditions as the first data processing, the result indicates that the three population could be divided in three subclusters (SC1, SC2, and SC3) with a low level of admixture (9 genotypes with $Q \leq 70\%$). The three subclusters contain 11, 12, and 17 accessions, respectively. Actually, the group (G1) of UPGMA tree and (A) in PCA graph is divided into two sub clusters (SC1 and SC2) by subclustering with STRUCTURE, while the group (G2) of the UPGMA tree and (B) in PCA graph correspond to the subcluster SC2, with some exceptions consisting in accessions that present an admixture of gene pools: Sebseb11, Adrar21, Sebseb12, El Oued2, El Oued44, Hiba 23, Adrar23, Adrar22, and El Oued41. Overall, there is no evidence that the accessions from the south are grouped in accordance to their location sites; they are dispersed in different cluster indicating their diverse nature (Varshney et al. 2009).

In the present study, most genetic variation (greater than 90%) was found within the 4 surveyed accessions and 8.9% of the variation was observed among populations based

on AMOVA analysis. This result increased to 10.3% when running AMOVA according to the subspecies affiliation. Results are in line with those of Varshney et al. (2009), who reported a majority of variation between (98.5%) individuals within each geographical origin, and only 1.5% of observed variation was accounted for between geographical regions, whereas Ren et al. (2014) revealed that the total genetic variance of the geographic origins was 31% which indicates a difference between peanut cultivars from China.

In the present study, the analysis of Algerian peanut indicates that the accessions could be distinguished on the basis of the subspecies affiliation (*fastigiata* ssp. and *hypogaea* ssp.) rather than the geographic location from where they are cultivated.

Conclusion

A study of genetic diversity is one of the most important tools which help researchers to understand, enhance, conserve, and use plant resources. The present work reports for the first time a study of genetic diversity and population structure of Algerian peanut accessions using molecular markers. The results obtained reveal that all the markers used in this study were polymorphic and highly informative. Thus, studied collection showed a high genetic diversity within individuals with higher inbreeding coefficients. Bayesian analysis, UPGMA, and PCA clustered the studied populations into two groups according to their geographic origin except for Timimoune and Berrihane accessions due to the presence of the two subspecies of *A. hypogaea* in the studied collection. Results showed also a case of homonymy in Berrihane 1 and Berrihane 2 accessions. Information generated in this study will contribute to the knowledge and the conservation of Algerian peanut genotypes and support a selection of accessions with target agronomic characteristics.

Acknowledgements The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research, the General Directorate of Scientific Research and Technological Development, Algeria; and the Biotechnology research Center (CRBT) of Constantine, especially Mr Ali Debbi.

Author Contribution HD conceived the work, designed and performed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. IB was a major contributor in writing the manuscript and reviewing and editing the paper. RB contributed to experiments, analyzed the data, and wrote the paper. AB to experiments, analyzed the data and wrote the paper. DK contributed to supervision and project administration. All authors have read and approved the final manuscript.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

References

- Barkley NA, Dean RE, Pittman RN, Wang ML, Holbrook CC, Pederson GA (2007) Genetic diversity of cultivated and wild-type peanuts evaluated with M13-tailed SSR markers and sequencing. *Genet Res* 89:93–106. <https://doi.org/10.1007/S0016672307008695>
- Benbouza H, Jacquemin JM, Bandoïn JP, Mergeai G (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ* 10:77–81
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331
- Boudchicha RH, Hormaza JL, Benbouza H (2018) Diversity analysis and genetic relationships among local Algerian fig cultivars (*Ficus carica* L.) using SSR markers. *S Afr J Bot* 116:207–215. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.015>
- Clark LV, Schreier AD (2017) Resolving microsatellite genotype ambiguity in populations of allopolyploid and diploidized autopolyploid organisms using negative correlations between allelic variables. *Mol Ecol Resour* 17:1090–1103. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12639>
- Clark LV, Jasieniuk M (2011) POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol Ecol Resour* 11:562–566. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13–15
- De E, Vonholdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- FAO (2018) Food and Agricultural Organization of the United Nations. FAO Statistical database. <http://faostat.fao.org>. Accessed 29 June 2020
- Ferguson ME, Buraw M, Schultze SR, Bramel P, Paterson AH, Kresovich S, and Mitchell S (2005) Sequence-tagged Microsatellites reveal Polymorphism in Peanut (*A. hypogaea* L.): Microsatellite identification and characterization. Unpublished Database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/BZ999636>
- Gimenes MA, Hoshino AA, Barbosa AV, Palmieri DA, Lopes CR (2007) Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biol* 7(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-9>
- Guo HY, Wang ZL, Huang Z, Chen Z, Yang HB, Kang XY (2019) Genetic diversity and population structure of alnuscremastogyne as revealed by microsatellite markers. *Forests* 10:278. <https://doi.org/10.3390/f10030278>
- He G, Meng R, Newman M, Gao G, Pittman RN, Prakash CS (2003) Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biol* 3(1): 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-3>
- Henderson ST, Petes TD (1992) Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12:2749–2757. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.6.2749>
- Hopkins MS, Casa AM, Wang T, Mitchell SE, Dean RE, Kochert GD, Kresovich S (1999) Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci* 39(4):1243–1247. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900040047x>
- Hong Y, Chen X, Liang X, Liu H, Zhou G, Li S, Wen S, Holbrook CC, Guo B (2010) A SSR-based composite genetic linkage map for the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genome. *BMC Plant Biol* 10:17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-17>
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- Krapovickas A, Gregory WC (1994) TAXONOMIA DEL GENERO *ARACHIS* (LEGUMINOSAE). *Bonplandia*, pp 1–186
- Krapovickas A, Gregory WC, Williams DE, Simpson CE (2007) Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 16:7–205
- Li Y, Chen CY, Knapp SJ, Culbreath AK, Holbrook CC, Guo B (2011) Characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and genetic relationships within cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Sci* 38(1): 1–10. <https://doi.org/10.3146/PS10-10.1>
- Mace ES, Yuejin W, Boshou L, Upadhyaya HD, Chandra S, Crouch JH (2007) Simple sequence repeat (SSR)-based diversity analysis of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to bacterial wilt. *Plant Genet Resour: Characterization and Utilization* 5:27–36. <https://doi.org/10.1017/S1479262107390916>
- Meirmans PG (2020) genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Mol Ecol Resour* 20:1126–1131. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13145>
- Moretzsohn MC, Leoi L, Proite K, Guimarães PM, Leal-Bertioli SCM, Gimenes MA et al (2005) A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theor Appl Genet* 111(6): 1060–1071. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0028-x>
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175–182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1993.01-9-00999.x>
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Genet* 30:371–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.371>
- Pandey MK, Gautami B, Jayakumar T, Sriswathi M, Upadhyaya HD, Chennubiregowda MV, Radhakrishnan T, Bertioli DJ, Knapp SJ, Cook DR, Varshney RK (2012) Highly informative genic and genomic SSR markers to facilitate molecular breeding in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *Plant Breed* 131:139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01911.x>
- Pasupuleti J, Nigam SN (2013) Phenotyping for groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improvement. In: Pasupuleti and Nigam SN (ed) *Phenotyping for Plant Breeding*. Springer, New York, pp 129–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8320-5_5
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Rafalski JA, Vogel JM, Morgante M, Powell W, Andre C, Tingey SV (1996) Generating and using DNA markers in plants. In: Birren B, Lai E (ed) *Nonmammalian genomic analysis*. Academic Press, pp 75–134
- Ramasamy RK, Ramasamy S, Bindoo BB, Naik VG (2014) STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *Springer plus* 3:431. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-431>
- Ren X, Jiang H, Yan Z, Chen Y, Zhou X, Huang L, Lei Y, Huang J, Yan L, Qi Y, Wei W, Liao B (2014) Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers. *PLoS One* 9: e88091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088091>
- Rohlf FJ (1997) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02 e. Exeter Software, New York, USA
- Schlötterer C, Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20:211–215. <https://doi.org/10.1093/nar/20.2.211>
- Seijo G, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse DA, Bertioli DJ, Moscone EA (2007) Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives

- revealed by double GISH. *Am J Bot* 94:1963–1971. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1963>
- Seijo JG, Lavia GI, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse D, Moscone EA (2004) Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *Am J Bot* 91:1294–1303. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1294>
- Tang Wang C, Dao Yang X, Xu Chen D, Lin YuS, Zhen Liu G, Yi Tang Y, Zhi XuJ (2007) Isolation of simple sequence repeats from groundnut. *Electron J Biotechnol* 10(3):473–480. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-10>
- Valls JF, Simpson CE (2005) New species of *Arachis* (leguminosae) from Brazil, Paraguay, and Bolivia. *Bonplandia* 14:35–63
- Van De Peer Y, De Wachter R (1994) Treecon for windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the microsoft windows environment. *Bioinformatics* 10:569–570. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.5.569>
- Varshney RK, Mahendar T, Aruna R, Nigam SN, Neelima K, Vadez V, Hoisington DA (2009) High level of natural variation in a groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm collection assayed by selected informative SSR markers. *Plant Breeding* 128:486–494. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01638.x>
- Wang H, Khara P, Huang B, Yuan M, Katam R, Zhuang W, Harris-Shultz K, M. Moore K, K. Culbreath A, Zhang X, K. Varshney R, Xie L, Guo B (2016) Analysis of genetic diversity and population structure of peanut cultivars and breeding lines from China, India and the US using simple sequence repeat markers. *J Integr Plant Biol* 58:452–465. <https://doi.org/10.1111/jipb.12380>
- Wang ML, Sukumaran S, Barkley NA, Chen Z, Chen CY, Guo B, Pittman RN, Stalker HT, Holbrook CC, Pederson GA, Yu J (2011) Population structure and marker-trait association analysis of the US peanut (*Arachis hypogaea* L.) mini-core collection. *Theor Appl Genet* 123:1307–1317. <https://doi.org/10.1007/2Fs00122-011-1668-7>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Partie II

**Evaluation de l'allergénicité de
l'arachide**

Chapitre III

Identification d'accessions hypoallergéniques d'arachide (*Arachis hypogaea*) en utilisant un modèle de souris Balb/c

Préambule

L'allergie alimentaire est un problème de santé mondiale qui ne cesse de prendre de l'ampleur. L'arachide occupe la troisième cause des allergies alimentaires dans le monde à côté du lait et des œufs, cette allergie se manifeste par des symptômes allant d'une simple diarrhée jusqu'au choc anaphylactique qui peut causer la mort. En effet, son incidence est en constante et rapide augmentation notamment pour les enfants et même pour les adultes.

En l'absence totale des études sur l'ampleur nationale de cette pathologie et le pouvoir allergénique des cultivars algériens, l'objectif de ce travail est d'évaluer l'allergénicité des protéines totales de six accessions d'arachide cultivées dans quatre wilayas du pays en utilisant un modèle de souris Balb/c.

Dans ce chapitre, le pouvoir allergénique des protéines extraites de six accessions d'arachide locales cultivées dans différentes régions du pays a été étudié. La compréhension des allergies alimentaires par le développement des modèles animaux qui reflètent les réactions humaines et l'utilisation des souris Balb/c comme modèle animal pour évaluer l'allergénicité des protéines d'arachide et pour décrire la réponse immunitaire IgE et IgG ainsi que l'identification des différents allergènes par western blot sont présentés dans **une revue de synthèse soumise pour publication dans le journal «*International Immunopharmacology*» en 2022.**

Les dosages des anticorps spécifiques de type IgG et IgE par la technique ELISA ainsi que les symptômes du choc anaphylactique enregistré après le test de provocation appuyés par l'étude histologique du jéjunum ont permis d'effectuer une classification des cultivars en fonction de leur potentiel allergénique et suggèrent que l'accession Timimoune est l'accession la plus hypoallergénique et que les accessions appartenant à la sous espèce *fastigiata* sont moins allergéniques que celles qui appartiennent à la sous espèce *hypogaea*.

Malgré que les résultats de cette étude offrent une évaluation pertinente des accessions d'arachide étudiées et suggèrent l'utilisation des accessions cultivées dans le sud Algérien pour la culture et l'industrie oléagineuse, il serait préférable d'effectuer une électrophorèse à deux dimensions suivie d'une analyse LC/MS/MS afin d'identifier les isoformes des allergènes potentiels et de fournir des informations supplémentaires sur les séquences peptidiques.

**Article 3: Identification of hypoallergenic peanut (*Arachis hypogaea*)
accessions using Balb/c mice model**

Hanène Djeghim, Ines Bellil, Esmâ Temim, Houda Boufendi and Douadi
Khelifi

1 Identification of hypoallergenic peanut (*Arachis hypogaea*) accessions using 2 Balb/c mice model

3 Hanène Djeghim^{1,2}, Ines Bellil^{*1}, Esmâ Temim³, Houda Boufendi³ and Douadi Khetifi^{1,4}

4 ¹Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologie Végétale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,
5 Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine 25000, Algérie, ²Laboratoire de Biochimie, Division de
6 Biotechnologie et Santé, Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine 25000, Algérie.

7 ³Laboratoire de Microscopie et Diagnostic Génétique, Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), 25000
8 Constantine, Algérie. ⁴Ecole Nationale Supérieure De Biotechnologie (ENSB), Constantine 25000, Algérie.

9 Abstract

10 Food allergy is a worldwide health problem. Among the food allergens, peanut accounted as
11 one of the most cause of anaphylaxis. Considering that, studies of peanut allergy didn't make
12 the subject of intensive interest in Algeria. The purpose of this research, was to develop a
13 BALB/c mouse model for comprehensively assessing and classify the allergenicity of six local
14 peanut accessions. The aim was also to evaluate the impact of genetic and geographic diversity
15 on allergenicity of these accessions. Serum specific IgE, IgG and IgG1 antibodies against
16 peanut proteins presented high levels and revealed the ability of used mouse model to traduce
17 the differential allergenicity of the studied accessions. Findings reports also that Timimoune
18 was the hypoallergenic accession compared to the studied ones. In this regard, we suggest the
19 use of Saharan Algerian peanut accessions for cultivation and industry in order to fighting
20 against peanut allergy problem.

21 **Key words:** *Arachis hypogaea*, Mouse model, Allergenicity, Algerian.

22 1. Introduction

23 Food allergy is one of the most important food safety problems that has attracted increasing
24 attention. The occurrence of food allergies has amplified over the years that have offered serious
25 challenges to both allergologists and food scientists (Katz et al., 2010). Foods associated with
26 allergy can be broadly divided into two groups: those, such as milk and eggs, and those,
27 including peanuts, tree nuts, fish, and shellfish. Of the foods in the second group, peanuts, which
28 are inexpensive and frequently eaten in unmodified form and as components of many prepared
29 foods, cause a large number of cases of severe anaphylaxis and death in the world (Sicherer &
30 Sampson, 2010). Moreover, the prevalence of peanut allergy may vary from country to country
31 or from continent to continent because of dietary preferences of populations (Iqbal et al., 2018).
32 This along with evidence that the incidence of peanut allergy is increasing. Thus, several
33 researches were carried out in this context in order to study peanut allergens and their clinical
34 effects (Finkelman, 2010; Lefèvre et al., 2016; Xue et al., 2016).

35 The major food allergens are water-soluble glycoproteins, which have molecular masses
36 ranging from 10 to 70 kDa and are more stable to treatment with heat, acid, and proteases
37 (Nowak-Węgrzyn et al., 2017). It is also known that only a minor section of proteins from
38 various families in a particular food initiate an allergenic reaction (Masilamani et al., 2012).
39 Peanuts contain between 20 to 30% of allergenic proteins (Zhou et al., 2013). The humoral
40 immune response to peanut allergens in susceptible individuals is more strongly IgE biased
41 (Masilamani et al., 2012). To date, 17 proteins present in peanuts are officially recognized by
42 the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS)
43 subcommittee as allergens (Pitre et al., 2020; International Union of Immunological Societies,

2021). Although, several of these include isomers and some distinctly named proteins, for example Ara h 2 and Ara h 6 are paralogs related as tandem gene duplicates (Masilamani et al., 2012). The most immunodominant allergens are Ara h 2, Ara h 6, and Ara h 1 (Schmitt et al., 2004; Chen et al., 2013). Geographic variation in sensitization to specific peanut allergens has been recognized, but it is reactivity to Ara h 2 and Ara h 6 that has increasingly emerged as the major risk factor for significant clinical reactivity (Palladino & Breiteneder, 2018; Frith & Katelaris, 2019).

In recent years, researchers assessed food allergens mainly through bioinformatics analysis, simulated gastric digestion, serological analysis, cell models, and animal models (Huang et al., 2018). The animal model test is the most direct method to evaluate the potential allergenicity of food. Among strains of mouse used to study food allergy, BALB/c mouse is a high-IgE response strain widely used in the study of hypersensitive diseases (Zhou et al., 2016). In this study, we tried to highlight the importance of peanut allergy in Algeria regarding the total absence of studies on the subject. Our aim was to analyse the allergenic capacity of proteins extracted from six accessions of local peanuts cultivated in different regions of the country. A challenge in understanding food allergies is to develop animal models that mirror human reactions. Therefore, in the present study Balb/c mice were used as an animal model to assess the allergenicity of peanut proteins and to describe the IgE and IgG immune response.

2. Material and Methods

2.1. Sample Collection

Six peanut (*Arachis hypogaea*) accessions genetically distant belonging to two subspecies *A. Hypogaea* ssp *hypogaea* and *A. Hypogaea* ssp *fastigiata* (Djeghim et al., 2021a, 2021b), were used in the present work. These accessions were collected from four principal areas of peanut production in Algeria, including El Taref, Ghardaïa, El Oued, and Adrar (Tab. 1).

Table 1. The set of Algerian peanuts (*A. hypogaea*) accessions studied and their geographical origin

Geographic origin	Region of the collect	Subspecies affiliation	Accession name	Geographic zone	Bioclimatic floor
Taref	Berrihane, El kala	<i>fastigiata</i>	Berrihane 01	Coastal	Subhumid
	Lamaissia, El kala		Lamaissia 01		
	El Frin, El kala		El Frin		
Ghardaïa	Sebseb	<i>hypogaea</i>	Sebseb 01	North Sahara	Saharian
El Oued	Guemar		El Oued 01	Central Sahara	
Adrar	Timimoune		Timimoune		

2.2. Protein extraction and electrophoresis

Peanut protein extract (PPE) was prepared as described by Duarte et al., 2011 with minor modification. In brief, 10 g of de-fatted dried peanut flour was extracted in 50 ml of 20 mM phosphate-Buffer (pH 7.4). The mixture was centrifuged at 3000×g during 30 min and 4°C. After centrifugation, the recovered supernatant was re-centrifuged once again at 10,000×g for 30 min at 4°C. Final supernatant was lyophilized and conserved at 4°C. The protein extracts

76 were analyzed using Bradford assay and SDS polyacrylamide gel according to Laemmli (1970)
77 with minor modifications to assess the extraction efficacy and to verify the presence of the
78 major allergic proteins.

79 **2.3. Animals**

80 All animal procedures were approved by an independent ethics committee for animal
81 experimentation (Ethical Committee of Animal Research in Biotechnology Research Center
82 (CRBt) of Constantine). 6-week old female BALB/c mice (total $n = 70$) were used in the present
83 work. The animals were housed at the animal facility of Biotechnology Research Center (CRBt)
84 on a 12 h light/dark cycle, in filter-topped macrolon cages ($n = 10$ per cage) on woodchip
85 bedding. Food and water were provided.

86 **2.4. Immunization Protocol**

87 Different groups of Balb/c mice were intraperitoneally (i.p) injected with 10 μ g of PPE adsorbed
88 to 2 mg of Alum [Al(OH)₃] in 0.1 ml phosphate buffered saline (PBS) solution on days 0, 14,
89 21, and 28 (HogenEsch, 2002). Subsequently, the mice were challenged with 1mg of PPE on
90 day 35 and non-sensitized mice ($n = 10$) were used as control. Blood samples were collected
91 from sensitive and naïve mice, on days 0, 14, 21, and 28, sampling blood was collected 1 hr
92 before mice were sensitized. On day 35, blood was collected 30 min after challenge. Finally,
93 blood samples were centrifuged and recovered serum were stored at -20°C until evaluation of
94 total IgG, IgG₁, and IgE titers.

95 **2.5. In vivo hypersensitivity response to peanut**

96 Anaphylactic symptoms of mice were evaluated 30min after ip challenge with 1mg of peanut
97 as previously reported (Schülke & Albrecht, 2019). The symptoms were quantified by using
98 the following previously reported scoring system (Schülke & Albrecht, 2019): 0, No symptoms;
99 1, Scratching and rubbing around nose and head; 2, Puffiness around eyes and mouth, diarrhea,
100 pillar erect, reduced activity, and/or decreased activity with increased respiratory rate; 3,
101 Wheezing, labored respiration, and cyanosis around mouth and tail; 4, No activity after
102 prodding or tremor and convulsion; 5, Death.

103 **2.6. ELISA assays for serum antibody titers**

104 Total IgG, IgG₁, and IgE anti-PPE titers in the sera from both control and test groups of mice
105 were assessed by indirect ELISA. The 96-well microtiter plate were coated with 100 μ l of PPE
106 at a concentration of 15 μ g/ml in PBS buffer (0.1 M, pH 7.4) for IgG antibodies and 100 μ g/ml
107 for IgE. The plate was then incubated overnight at 4°C . After incubation, the wells were washed
108 three times with PBS-Tween and blocked with 3% BSA PBS for 2 h at 37°C . After washing
109 the plate, the wells were further incubated with 100 μ l of diluted sera (1:1000 for IgG antibody's
110 and 1:50 for IgE) for 2 h at 37°C . The unbound serum constituents were washed off and the
111 levels of bound IgG and IgE were measured by incubating with 100 μ l of horseradish
112 peroxidase (HRP) conjugates specific antibodies (1:2500 dilution, Invitrogen, 62-6520 for IgG;
113 1:7500 dilution, Abcam, ab97240 for IgG₁, and 1:4000 dilution, Southernbiotech, 1110-05 for
114 IgE) for 90 min at 37°C . Finally, the unbound conjugates were washed with PBS-T three times
115 and 100 μ l of freshly prepared substrate solution (OPD, Sigma, P-5412) was added per well.
116 The reaction was stopped after 15 to 30 min by adding 50 μ L of $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ and the developed

117 colour was read at 490 nm using automatic ELISA reader (EnSpir, Multimode Plate Reader).
118 IgE antibodies concentrations were calculated using unlabelled Goat Anti-Mouse IgE
119 (Southernbiotech,1110-01) as a standard.

120 **2.7. Histological sections of jejunal tissues**

121 Jejunum segments were processed for histological analysis using the Hould method (1984).
122 Tissues were fixed in 10% of formalin solution, longitudinally embedded in paraffin, cut into 5
123 μm of thick sections and subsequently stained with hematoxylin-eosin. An optical microscope
124 (LEICA DM 1000 LED) was used to assess histological changes.

125 **2.8. Data analysis**

126 Data are presented as mean \pm standard error of mean. Comparisons between groups were
127 performed using analysis of variance (ANOVA) with Tukey's and Dunnett's tests using
128 XLSTAT software. A P-value of < 0.05 was considered statistically significant.

129 **3. Results**

130 **3.1. Total protein extract**

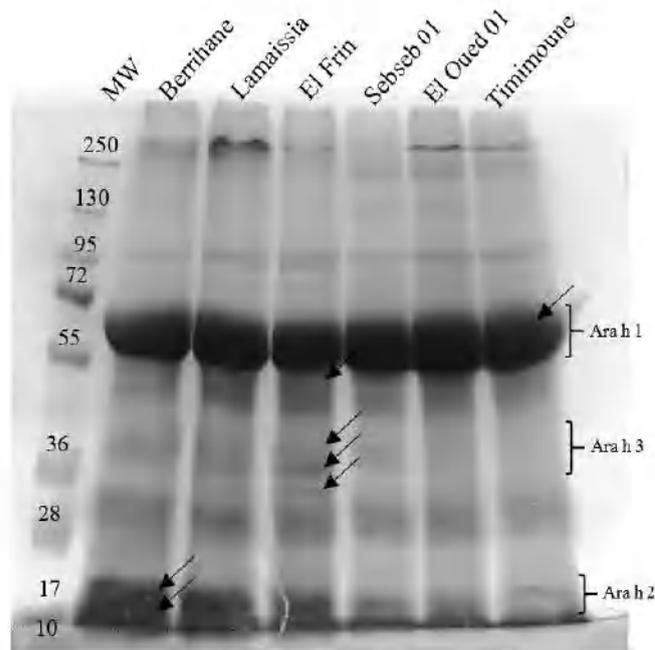
131 Since protein is recognized as the allergenic substance in peanut, total protein extracts of each
132 accession were analyzed using Bradford method and SDS PAGE. Results showed that the total
133 protein content varied between 18.17% and 30.20% (**Tab. 2**).

134 **Table 2.** Total protein content of the peanut studied accessions.

Accession name	Total protein content (%)
Berrihane 01	22.71 \pm 0.87
Lamaissia 01	30.20 \pm 1.01
Sebseb 01	23.95 \pm 0.53
El Oued 01	23.67 \pm 0.46
El Frin	18.17 \pm 0.34
Timimoune	24.63 \pm 0.67

135 Many authors were described peanut allergens (Burks et al., 1995; Chatel et al., 2003; Hales et
136 al., 2004; Yusnawan et al., 2012). The obtained electrophoresis profiles showed bands
137 corresponding to the major allergens at 64 kDa for Ara h 1, 17 and 19 kDa for Ara h 2.01 and
138 Ara h 2.02 respectively, and 37, 42, 45, and 60 kDa for Ara h3 subunits (**Fig.1**).

139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150



151 **Figure 1.** Electrophoretic banding pattern generated by SDS-PAGE of accessions protein
152 extracts.

153 **3.2. Hypersensitivity response of sensitized mouse**

154 The biological significance of peanut sensitization in different mouse groups was further
155 evaluated by measurement of the response to ip challenge with PPE (**Tab. 3**). The peanut
156 challenge produced clinical signs of allergic reaction in all mouse groups except for those
157 sensitized with proteins extracted from Timimoune accession (Group 6). Moderate clinical
158 signs were observed in groups 1, 3, 4, and 5 (sensitized with proteins extracted from Berrihane
159 01, Sebseb 01, El Oued 01 and El Frin accessions respectively) characterized by puffiness
160 around eyes and mouth and diarrhea. Moreover, group 2 presented several clinical signs varied
161 from wheezing and labored respiration to immobility after prodding and tremor.

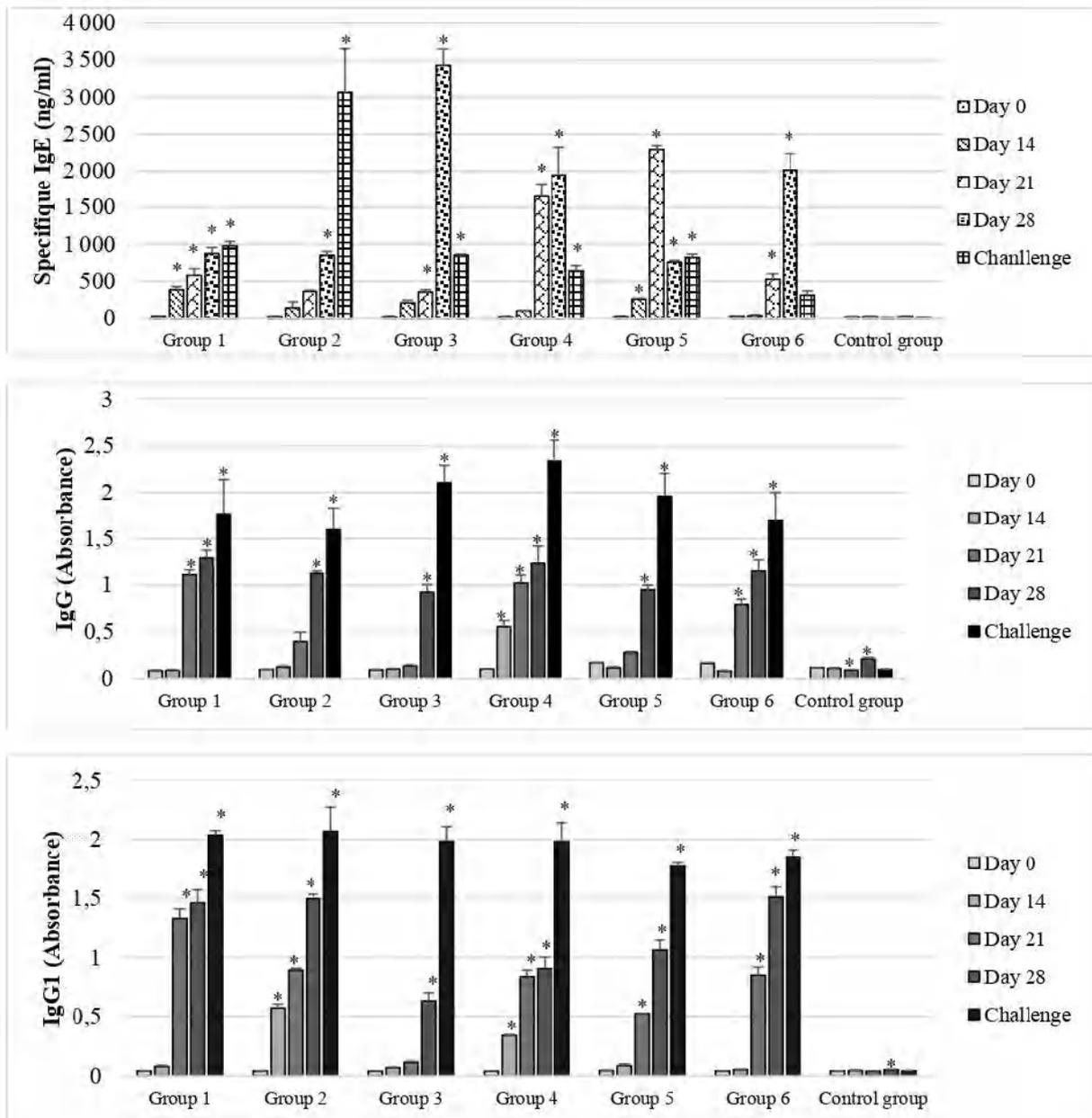
162 **Table 3.** Hypersensitivity response in control and peanut-sensitized mice after ip challenge

Accession extracted proteins	Group of mice	Number of mice	Systematic anaphylactic reactions score	% of deaths
Berrihane 01	G1	6	2	0
Lamaïssia 01	G2	6	3-4	0
Sebseb 01	G3	6	2-3	0
El Oued 01	G4	7	1	0
El Frin	G5	7	2	0
Timimoune	G6	7	0	0
/	Control	5	0	0

163

164 **3.3. PPE specific antibody titers**

165 Anti-PPE immunoglobulin titers of all groups were measured in sera of mice. Significantly
 166 higher titers of IgG, IgG1, and IgE were detected in the serum (**Fig.2**), characterized by a high
 167 IgG1 titers reflecting the Th2 orientation of the immune response. No specific IgE antibodies
 168 could be detected in naïve mice. PPE-specific IgE titers were significantly increased after the
 169 second injection for most sensitized groups. Although, important modifications were observed
 170 between sensitized groups and the control one.



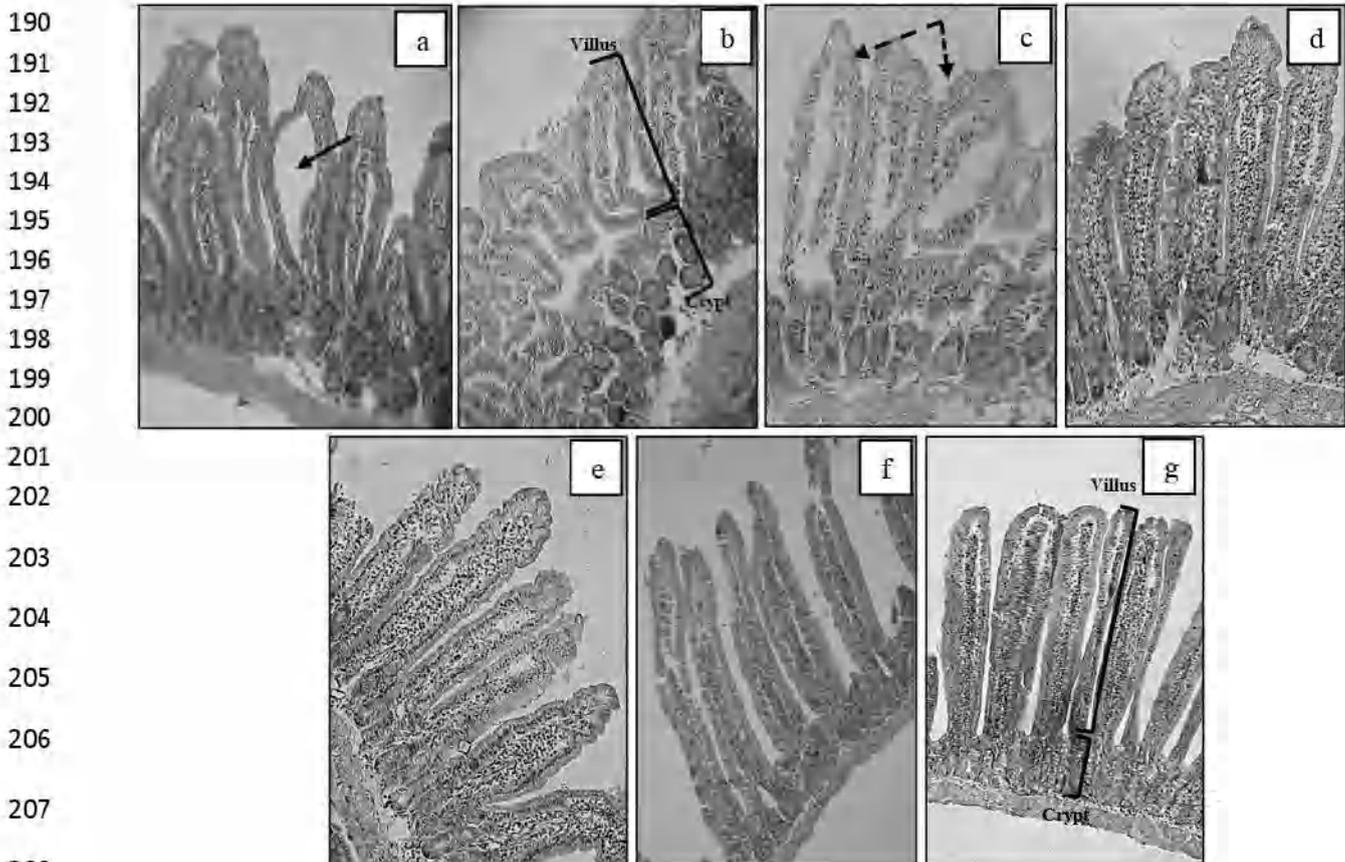
171 **Figure 2.** PPE-specific serum immunoglobulin IgE, IgG, and IgG1 antibody titers in serum of
 172 control and immunised mice. * Significantly different from day 0 ($P < 0.05$).

173 The differential allergenic ability of peanut proteins results in a different immune response of
 174 mice on the challenge. Group 6 presented the least specific IgE anti PPE titer with 312.39 ± 57.11
 175 ng/ml revealing the low allergenic ability of Timimoune accession proteins. However,

176 comparable titers of specific IgE were expressed by the groups 1, 3, 4, and 5 varied from
177 976.78±62,65 ng/ml for group 1 to 639.82±72.31 for group 4. Nevertheless, a high specific IgE
178 titer was observed in group 2 exhibited the high allergenic ability of Lamaissia 01 accession
179 proteins (3063.20±592.42 ng/ml). A high IgG and IgG1 titers were also noticed and increased
180 with the injection's days, reaching a maximum of absorbance on day 35 for all sensitized groups
181 (2.34±0.22 for group 4 and 2.07±0.20 for group 2, respectively).

182 3.4. Histological analysis

183 Observed histological sections of jejunal tissues (**Fig. 3**) revealed regular villi with unstratified
184 epithelium in the naïve group. However, treated groups showed mainly a villus atrophy with an
185 irregular jejunal structures and a great damage of the internal tissue. This indicates that different
186 peanut proteins cause allergic inflammation leading to jejunal damage and crypt hyperplasia.
187 Comparing the histological sections mice of naïve group with those of the treated groups, the
188 group 2 exhibit the most damaged structures of the villi with significant infiltration of
189 inflammatory cells. Mice of this group, were suffered from diarrhea during the challenge.



208
209 **Figure 3.** Light microscopy ($G \times 10$) showing histological sections of jejunal tissues stained
210 with hematoxylin and eosin, broken arrows indicate villous enlargement, large solid arrow
211 indicate edema. (a) Group 1; (b) Group 2; (c) Group 3; (d) Group 4; (e) Group 5; (f) Group 6;
212 (g) Control group.

213

214

215 *4. Discussion*

216 Although peanut allergy is a very important worldwide problem, to date no study has been
217 performed to estimate the prevalence of this allergy in Algeria or to assess the allergenicity of
218 local peanut varieties. In the present work, the BALB/c strain mouse was selected to evaluate
219 the allergenic potential of proteins extracted from six Algerian peanut accessions using the ip
220 route. In fact, because of their predisposition to make strong IgE antibody responses, Balb/c
221 mice was widely used in the study of IgE-mediated allergies and hypersensitive diseases (Kips
222 et al., 2003; Zhou et al., 2016). Dearman et al., (2003) utilized BALB/c mice to distinguish
223 between allergenic proteins and proteins that, although immunogenic, lack the potential to cause
224 allergic sensitization. The obtained results, reveal that the measurement of antibody (IgE)
225 responses in BALB/c can be adopted as a tool of discrimination between allergens and non-
226 allergenic substances. Similarly, Saldanha et al., 2004 sensitized the BALB/c mice by
227 subcutaneous injection of ovalbumin adsorbed on Alum as an adjuvant. Findings, report that
228 mice sensitized with ovalbumin and exposed to this antigen for long term at low dose via the
229 oral route can produce a high level of IgE and IgG1. Results suggest also that this model is
230 strongly related to Th2 cytokines. Despite that several studies believe that oral sensitized Balb/c
231 mice is a valid model to study food allergy (Adel-Patient et al., 2005; Chang et al. 2013; Pablos-
232 Tanarro et al., 2015; Orgel & Kulis, 2018). There are much studies evidence showing that the
233 sensitivity of BALB/c mice was easily tolerated by introduction of antigens via the
234 gastrointestinal route, this tolerance defined as the inhibition of specific antibodies formation
235 after subsequent parenteral immunizations with the same antigen (Weiner et al., 1994; Chen et
236 al., 1995; Weiner et al., 1997). In addition to that Dearman et al., 2002 compared the effects of
237 the two allergenic pathways of intraperitoneal injection and gastrectomy on OVA specific IgG
238 and IgE antibodies and found that only intraperitoneal injection of OVA resulted in the
239 production of more potent IgE antibodies. Consequently, the BALB/c mouse model is more
240 suitable for intraperitoneal injection to determine the intrinsic allergenicity of proteins.

241 In the present work, a quantitative determination of peanut proteins ability to bind IgE, IgG and
242 IgG1 antibodies was made by indirect ELISA technique. This technique is the most frequently
243 used due to its high precision, easy handling, and good potential for standardization (Poms et
244 al., 2004). Results showed a progressive increasing of IgG levels with the days of sensitization
245 until the challenge for all sensitized groups (**Fig. 2**). This result, illustrate the efficacy of the
246 immunization protocol applied in this study. It has been demonstrated that the murine models
247 possess a similar immune system mechanism of human especially for the Th1 and Th2
248 responses (Stavnezer, 1996; McKenzie et al., 1999). In fact, systemic anaphylaxis in mice can
249 be mediated largely through IgG1 and FcγRIII (Miyajima et al., 1997). In the current
250 investigation, high levels of IgG1 subclass were recorded for the all sensitized groups. In IgG1-
251 mediated systemic anaphylaxis, antigens can form complexes with specific IgG1, macrophages
252 or basophils can efficiently capture the IgG1-allergen complexes via FcγRIII expressed on their
253 surface and then macrophages or basophils release platelet-activating factor (PAF) upon
254 stimulation with IgG1-allergen complexes that cross-link cell FcγRIII (Humphrey et al., 1982;
255 Tsujimura et al., 2008). In line with the above, group 2 (sensitized with the protein extract of
256 Lamaissia 01 accession) presented the highest level of IgG1 on challenge day, and manifested
257 the several anaphylactic symptoms and demonstrated a significant ability of Lamaissia 01
258 proteins to produce an anaphylaxis. In contrast, mice of groups 5 and 6 (sensitized with the
259 protein extract of El Frim and Timimoune accessions respectively) presented the lowest IgG1

260 levels supporting results of anaphylactic scoring (**Tab. 3**) and elucidated the low capacity of
261 these proteins to induce anaphylactic shock. Since, IgG1 with anaphylactic activity required IL-
262 4 (IL-4 was produced by Th2-like cells) (Faquim-Mauro et al., 1999), the results described
263 previously illustrate a high Th2/IL-4 response. Correspondingly, according to Cardoso et al.,
264 2009, protein peanut sensitized C57BL/6 wild-type (WT) and IL-4^{-/-} challenged with peanut
265 seeds preserved gut integrity with no signs of mucosal inflammation. These animals presented
266 increased levels of IgG2a in sera demonstrate Th1 orientation of immune system.

267 Mice, like human beings, could suffer from IgE/FcεRI/mast cell-mediated gastrointestinal and
268 systemic anaphylaxis (Chen et al., 2017). Severe intestinal damage is associated with clinical
269 signs of systemic anaphylaxis. In fact, when the jejunum is not inflamed, the jejunal epithelial
270 cells and mesentery are complete and the intestinal villi are clearly visible. Jejunal structure and
271 intestinal villi will be destroyed following inflammation, which can even lead to the
272 disappearance of intestinal villi (Noti et al., 2014). In the present research, compared with naïve
273 mice, mouse jejunal structure showed various degrees of damage, and the infiltration of
274 inflammatory cells after sensitization using different accessions of peanut (**Fig. 3**). Most of the
275 histological sections presented villi atrophy (Group 1, 2, and 3) with a considerable reduction
276 of the ratio of villus length over crypt depth. These observations explain diarrhea observed
277 during the challenge. In addition, a histological section of jejunal tissue of group 3 was
278 characterized by villous enlargement. These results are in concordance with several published
279 studies showed that food allergy in mice is characterized by villus atrophy and goblet cell
280 hyperplasia, as well as infiltration of IgE-positive mast cells performing degranulation in the
281 jejunum and increased-histamine release (Sun et al., 2008; Huang et al., 2010; Chen et al., 2011;
282 Grar et al., 2015).

283 Although the importance of IgG1 and cytokines on the allergic reaction, IgE antibodies play a
284 primordial role in the degranulation of mast cells and histamine liberation. The differential
285 ability of peanut proteins to induce IgE antibody production reflects their allergenic potential.
286 IgE antibody concentrations were measured for each sensitization day. Findings report a
287 significant increase of IgE antibodies after the second sensitization (day 21) compared with
288 naïve group ($p < 0.05$ Dunnett test, data not shown). Similarly, Adel-Patient and colleagues
289 (Adel-Patient et al., 2005) registered a high IgE antibodies concentration after the second
290 administration of WPPE (Whole Protein Peanut Extract) on Balb/c mice using i.p route.
291 Different IgE titers were produced after the challenge. Thus, all mice groups were revealed a
292 high significant concentration of IgE antibodies comparing with the control group. However,
293 the group 6 was showed a non-significant and the lowest antibody titer (312.39 ± 57.11 ng/ml).
294 The obtained results showed also that accession extracted proteins can be classified regarding
295 their potential of allergenicity in reference to the IgE expressed titers as following: Timimoune
296 < El Oued 01 < El Frim < Sebseb 01 < Berrihane 01 < Lamaïssia 01. Referring to these results,
297 accessions belonging to *A. hypogaea hypogaea* sub-specie were more hypoallergenic to those
298 belonging to *A. hypogaea fastigiata* sub-specie. In opposition, Pandey et al., 2019 was quantify
299 five allergens (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, and Ara h 8) between two subspecies of
300 cultivated peanut *hypogaea* ssp (96 accessions) and *fastigiata* ssp (148 accessions). Results
301 reported that accessions attributed to ssp *hypogaea* were more allergenic compared to ssp
302 *fastigiata* accessions, this dissimilarity may be explained by the genetic and geographic
303 diversity induced protein modifications and generate a substantial impact on the elicitation of
304 protein-specific immune (Bogh et al., 2016).

305 **5. Conclusion**

306 In this study, Balb/c mouse was used to examine the potential allergenicity of six Algerian
307 peanut accessions. Results showed that the intraperitoneal BALB/c mouse model might be a
308 valuable model to identify the allergenicity of different peanut accessions and research clinical
309 symptoms of food allergy. Results reports also that accessions belonging to *hypogaea* spp were
310 hypoallergenic comparing to those belonging to *fastigiata* spp. Using obtained IgE titers we
311 can provide a classification of studied accessions based on allergenicity potential as following:
312 Timimoune < El Oued 01 < El Frin < Sebseb 01 < Berrihane 01 < Lamaissia 01. Finally, beside
313 the results of this study help to evaluate the allergenicity of Algerian peanut accessions, it will
314 be important to complete this study using a larger number of groundnut accessions.
315 Additionally, a proteomic study of these peanut proteins was not conducted here but clearly
316 deserve further study to investigate potential allergens isoform and to provide enhanced
317 peptide-sequence information.

318 **Disclosure of funding to the study**

319 None.

320 **Disclosure of any conflict of interest**

321 The authors declare no conflicts of interest.

322 **Acknowledgements**

323 The authors gratefully thank the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific
324 Research, the General Directorate of Scientific Research and Technological Development,
325 Algeria and the Biotechnology research Center (CRBt) of Constantine, especially Mr Saâd
326 Mebrek.

327 **References**

328 Adel-Patient, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., & Wal, J. M. (2005). Peanut-and
329 cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally
330 sensitized with cholera toxin. *Allergy*, 60(5), 658-664. [https://doi.org/10.1111/j.1398-](https://doi.org/10.1111/j.1398-331.9995.2005.00767.x)

332 Bøgh, K. L., van Bilsen, J., Głogowski, R., López-Expósito, I., Bouchaud, G., Blanchard, C.,
333 ... & O'mahony, L. (2016). Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of
334 food allergens in animal models. *Clinical and translational allergy*, 6(1), 1-13.
335 <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0110-2>.

336 Cardoso, C. R., Provinciatto, P. R., Godoi, D. F., Ferreira, B. R., Teixeira, G., Rossi, M. A., ...
337 & Silva, J. S. (2009). IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food
338 allergy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(3), G593-
339 G600. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90431.2008>.

340 Chang, L., Sampson, H. A., & Masilamani, M. (2013). Oral Sensitization to Peanut in Balb/c
341 Mice Is Enhanced by Dietary Elimination of Soybean Components-towards a Better Mouse Model
342 for Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2), AB218.
343 <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1447>.

344 Chen, C., Lianhua, L., Nana, S., Yongning, L., & Xudong, J. (2017). Development of a BALB/c
345 mouse model for food allergy: comparison of allergy-related responses to peanut agglutinin, β -

346 lactoglobulin and potato acid phosphatase. *Toxicology research*, 6(2), 251-261.
 347 <https://doi.org/10.1039/c6tx00371k>.

348 Chen, X. W., Lau, K. W. K., Yang, F., Sun, S. S. M., & Fung, M. C. (2011). An adjuvant free
 349 mouse model of oral allergenic sensitization to rice seeds protein. *BMC gastroenterology*, 11(1),
 350 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-62>.

351 Chen, X., Wang, Q., El-Mezayen, R., Zhuang, Y., & Dreskin, S. C. (2013). Ara h 2 and Ara h
 352 6 have similar allergenic activity and are substantially redundant. *International archives of allergy*
 353 and immunology, 160(3), 251-258. <https://doi.org/10.1159/000341642>.

354 Chen, Y., Inobe, J. I., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (1995).
 355 Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, 376(6536), 177-180.
 356 <https://doi.org/10.1038/376177a0>.

357 Dearman, R. J., Caddick, H., Stone, S., Kenna, J. G., Basketter, D. A., & Kimber, I. (2002).
 358 Immunogenic properties of rapidly digested food proteins following gavage exposure of mice: a
 359 comparison of ovalbumin with a potato acid phosphatase preparation. *Food and chemical*
 360 *toxicology*, 40(5), 625-633. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00132-6).

361 Dearman, R. J., Skinner, R. A., Herouet, C., Labay, K., Debruyne, E., & Kimber, I. (2003).
 362 Induction of IgE antibody responses by protein allergens: inter-laboratory comparisons. *Food and*
 363 *chemical toxicology*, 41(11), 1509-1516. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00167-4).

364 Djeghim, H., Bellil, I., Boudchicha, R. H., Boumegoura, A., & Khelifi, D. (2021a). First
 365 Records on Genetic Diversity and Population Structure of Algerian Peanut (*Arachis hypogaea*)
 366 Using Microsatellite Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*. [https://doi.org/10.1007/s11105-](https://doi.org/10.1007/s11105-021-01305-7)
 367 [021-01305-7](https://doi.org/10.1007/s11105-021-01305-7).

368 Djeghim, H., Bellil, I., Khelifi, D. (2021b). Genetic diversity of the Algerian peanut population
 369 analyzed using morphological markers and seed storage proteins. *Proceedings on applied botany,*
 370 *genetics and breeding*, 182(3). <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-9-22>.

371 Duarte, J., Caridade, M., & Graca, L. (2011). CD4-blockade can induce protection from peanut-
 372 induced anaphylaxis. *Frontiers in immunology*, 2, 56. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00056>.

373 Faquim-Mauro, E. L., Coffman, R. L., Abrahamsohn, I. A., & Macedo, M. S. (1999). Cutting
 374 edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially
 375 regulated by IL-4 and IL-12. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3572-3576.

376 Finkelman, F. D. (2010). Peanut allergy and anaphylaxis. *Current opinion in*
 377 *immunology*, 22(6), 783-788. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.005>.

378 Frith, K., & Katelaris, C. H. (2019). Current perspectives on peanut allergy. *Internal medicine*
 379 *journal*, 49(12), 1480-1487. <https://doi.org/10.1111/imj.14658>.

380 Grar, H., Dib, W., El Mecherfi, K. E., Negaoui, H., Gourine, H., Benattia, S. B., ... & Saidi, D.
 381 (2015). Supplementation with β -carotene or vitamin E protects against increase in anaphylactic
 382 response in β -lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: ex vivo study. *European Food Research and*
 383 *Technology*, 241(3), 393-398. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2471-5>.

384 HogenEsch, H. (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminium
 385 adjuvants. *Vaccine*, 20, S34-S39. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00169-X).

- 386 Hould, René. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Décarie editeur:
387 Montréal.
- 388 Huang, J., Liu, C., Wang, Y., Wang, C., Xie, M., Qian, Y., & Fu, L. (2018). Application of *in*
389 *vitro* and *in vivo* models in the study of food allergy. *Food Science and Human Wellness*, 7(4),
390 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.10.002>.
- 391 Huang, Q., Xu, H., Yu, Z., Gao, P., & Liu, S. (2010). Inbred Chinese Wuzhishan (WZS) minipig
392 model for soybean glycinin and β -conglycinin allergy. *Journal of agricultural and food chemistry*,
393 58(8), 5194-5198. <https://doi.org/10.1021/jf904536v>.
- 394 Humphrey, D. M., McManus, L. M., Satouchi, K., Hanahan, D. J., & Pinckard, R. N. (1982).
395 Vasoactive properties of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and analogues. *Laboratory*
396 *investigation; a journal of technical methods and pathology*, 46(4), 422-427.
- 397 Iqbal, A., Farooq Shah, Y. J., Hamayun, M., & Islam, B. (2018). Detection of food allergens
398 by ELISA and other common methods. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 8340-8346.
- 399 Katz, Y., Rajuan, N., Goldberg, M. R., Eisenberg, E., Heyman, E., Cohen, A., & Leslino, M.
400 (2010). Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein
401 allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(1), 77-82.
402 <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.04.020>.
- 403 Kips, J. C., Anderson, G. P., Fredberg, J. J., Herz, U., Inman, M. D., Jordana, M., ... & Chung,
404 K. F. (2003). Murine models of asthma. *European Respiratory Journal*, 22(2), 374-382.
405 <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00026403>.
- 406 Lefèvre, S., Jacquenet, S., & Kanny, G. (2016). Diagnostic de l'allergie alimentaire à l'arachide.
407 *Revue Française d'Allergologie*, 56(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2015.09.010>.
- 408 Masilamani, M., Commins, S., & Shreffler, W. (2012). Determinants of food
409 allergy. *Immunology and Allergy Clinics*, 32(1), 11-33. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2011.12.003>.
- 410 McKenzie, G. J., Fallon, P. G., Emson, C. L., Grecnis, R. K., & McKenzie, A. N. (1999).
411 Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell
412 type 2-mediated responses. *The Journal of experimental medicine*, 189(10), 1565-1572.
413 <https://doi.org/10.1084/jem.189.10.1565>.
- 414 Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T. R., Ravetch, J. V., Kinet, J. P., & Galli, S. J. (1997).
415 Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gamma RIII.
416 Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with
417 active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *The Journal of clinical investigation*, 99(5),
418 901-914. <https://doi.org/10.1172/JCI119255>.
- 419 Noti, M., Kim, B. S., Siracusa, M. C., Rak, G. D., Kubo, M., Moghaddam, A. E., ... & Artis, D.
420 (2014). Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through
421 the thymic stromal lymphopoietin-basophil axis. *Journal of allergy and clinical*
422 *immunology*, 133(5), 1390-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.021>.
- 423 Nowak-Węgrzyn, A., Burks, A. W., & Sampson, H. A. (2017). Food allergy and gastrointestinal
424 syndromes. In *Middleton's Allergy Essentials* (pp. 301-343). Elsevier.

425 Orgel, K., & Kulis, M. (2018). A mouse model of peanut allergy induced by sensitization
426 through the gastrointestinal tract. In *Type 2 Immunity* (pp. 39-47). Humana, New York, NY.
427 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7896-0_4.

428 Pablos-Tanarro, A., López-Expósito, I., Lozano-Ojalvo, D., López-Fandiño, R., & Molina, E.
429 (2016). Antibody production, anaphylactic signs, and T-cell responses induced by oral
430 sensitization with ovalbumin in BALB/c and C3H/HeOuJ mice. *Allergy, asthma & immunology*
431 *research*, 8(3), 239-245. <https://doi.org/10.4168/aaair.2016.8.3.239>.

432 Palladino, C., & Breiteneder, H. (2018). Peanut allergens. *Molecular immunology*, 100, 58-70.
433 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.04.005>.

434 Pandey, A. K., Sudini, H. K., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K., & Pandey, M. K. (2019).
435 Hypoallergen peanut lines identified through large-scale phenotyping of global diversity panel:
436 Providing hope toward addressing one of the major global food safety concerns. *Frontiers in*
437 *genetics*, 10, 1177. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01177>.

438 Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review.
439 *Food additives and contaminants*, 21(1), 1-31. <https://doi.org/10.1080/02652030310001620423>.

440 Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-
441 Leite, J. I., ... & Cara, D. C. (2004). A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-
442 sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6), 809-816.
443 <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000600005>.

444 Schmitt, D. A., Cheng, H., Maleki, S. J., & Burks, A. W. (2004). Competitive inhibition ELISA
445 for quantification of Ara h 1 and Ara h 2, the major allergens of peanuts. *Journal of AOAC*
446 *International*, 87(6), 1492-1497. <https://doi.org/10.1093/jaoac/87.6.1492>.

447 Schülke, S., & Albrecht, M. (2019). Mouse models for food allergies: Where do we stand ?
448 *Cells*, 8(6), 546. <https://doi.org/10.3390/cells8060546>.

449 Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of allergy and clinical*
450 *immunology*, 125(2), S116-S125. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>.

451 Stavnezer, J. (1996). Immunoglobulin class switching. *Current opinion in immunology*, 8(2),
452 199-205. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80058-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80058-6).

453 Sun, P., Li, D., Li, Z., Dong, B., & Wang, F. (2008). Effects of glycinin on IgE-mediated
454 increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. *The Journal of*
455 *nutritional biochemistry*, 19(9), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.nutbio.2007.08.007>.

456 Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., ... &
457 Karasuyama, H. (2008). Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not
458 immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, 28(4), 581-589.
459 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.008>.

460 Weiner, H. L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune
461 diseases. *Immunology today*, 18(7), 335-343. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01053-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01053-0).

462 Weiner, H. L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S. J., Al-Sabbagh, A., Santos, L., ... & Hafler,
463 D. A. (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-

464 specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annual review of
465 immunology, 12(1), 809-837. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.004113>.

466 Xue, W., Cong, Y., Shi, A., Deng, L., Sheng, X., & Liu, Y. (2016). Peanut Allergy. In Peanuts:
467 Processing Technology and Product Development (pp. 327-341). Academic Press.
468 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809595-9.00006-5>.

469 Zhou, C., Ludmila, T., Sun, N., Wang, C., Pu, Q., Huang, K., & Che, H. (2016). BALB/c mice
470 can be used to evaluate allergenicity of different food protein extracts. Food and Agricultural
471 Immunology, 27(5), 589-603. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1129600>.

472 Zhou, Y., Wang, J. S., Yang, X. J., Lin, D. H., Gao, Y. F., Su, Y. J., ... & Zheng, J. J. (2013).
473 Peanut allergy, allergen composition, and methods of reducing allergenicity: A
474 review. International journal of food science, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/909140>.

475 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
476 bacteriophage T4. nature, 227(5259), 680-685.

477 Burks, A. W., Cockrell, G., Stanley, J. S., Helm, R. M., & Bannon, G. A. (1995). Recombinant
478 peanut allergen Ara h I expression and IgE binding in patients with peanut hypersensitivity. The
479 Journal of clinical investigation, 96(4), 1715-1721. <https://doi.org/10.1172/JCI18216>.

480 Chatel, J. M., Bernard, H., & Orson, F. M. (2003). Isolation and characterization of two
481 complete Ara h 2 isoforms cDNA. International archives of allergy and immunology, 131(1), 14-
482 18. <https://doi.org/10.1159/000070429>.

483 Hales, B. J., Bosco, A., Mills, K. L., Hazell, L. A., Loh, R., Holt, P. G., & Thomas, W. R.
484 (2004). Isoforms of the major peanut allergen Ara h 2: IgE binding in children with peanut allergy.
485 International archives of allergy and immunology, 135(2), 101-107.
486 <https://doi.org/10.1159/000080652>.

487 Yusnawan, E., Marquis, C. P., & Lee, N. A. (2012). Purification and characterization of Ara h1
488 and Ara h3 from four peanut market types revealed higher order oligomeric structures. Journal of
489 agricultural and food chemistry, 60(41), 10352-10358. <https://doi.org/10.1021/jf302800e>.

490 International Union of Immunological Societies. Allergen Nomenclature. Available online
491 : <http://allergen.org> (accessed on 23 September 2021).

492 Pitre, M., L'Hocine, L., Achouri, A., Blaquièrre, M., & Des Roches, A. (2020). Immunoglobulin
493 E-Binding Pattern of Canadian Peanut Allergic Children and Cross-Reactivity with Almond,
494 Hazelnut and Pistachio. Biomolecules, 10(8), 1091. <https://doi.org/10.3390/biom10081091>.

Discussion générale

Discussion générale

Les études de la diversité des ressources phytogénétiques offrent aux agriculteurs l'opportunité de développer de nouveaux cultivars et d'améliorer des caractéristiques avec un intérêt agronomique (rendement potentiel, grosses graines, résistance aux différents phytopathogènes etc.). Depuis le tout début de l'agriculture, la variabilité génétique naturelle a été exploitée au sein des espèces cultivées pour répondre aux besoins alimentaires de subsistance. De nos jours, l'agriculture est non seulement considérée comme une machine de sécurité alimentaire, mais aussi une source importante de génération de revenus à la fois dans les secteurs agricole et non agricole. Cependant, la croissance démographique galopante, les conditions climatiques difficiles, la qualité des sols et leur dégradation constante ont diminué fortement l'autosuffisance alimentaire entraînant une surexploitation des ressources naturelles et des pratiques culturales non adaptées, ce qui conduit à l'extinction à grande échelle d'espèces végétales, en particulier de cultures vivrières importantes sur le plan agricole.

Dans un effort de préserver le patrimoine génétique des cultivars locaux d'arachide afin d'assurer la sécurité alimentaire, une caractérisation génétique en utilisant l'approche phénotypique, biochimique et moléculaire a été effectuée. Notre étude a porté sur une collection de trente accessions d'arachide cultivées dans les wilayas d'El Taref, El Oued, Ghardaïa et Adrar. A ce jour, aucune étude morphologique ni moléculaire n'a été entreprise pour caractériser la diversité génétique des cultivars locaux. Ce travail représente donc la première étude d'évaluation de la diversité génétique chez l'arachide Algérien. Aussi dans un souci de préserver la santé du citoyen et en se basant sur les résultats de la diversité génétique, une évaluation de l'allergénicité des accessions d'arachide les plus éloignées génétiquement en utilisant un modèle animal de souris Balb/c a été réalisée afin de caractériser les protéines allergènes de l'arachide d'une part et sélectionner les accessions et/ou les variétés hypoallergéniques d'autre part.

1. Etude de la diversité génétique en utilisant les marqueurs morphologiques

Au total, quarante marqueurs morphologiques (dont 25 descripteurs morphométriques et 15 descripteurs agronomiques), relatifs aux différentes parties de la plante (tige, feuille, fleur, gousse, graine et racine) décrits dans le descripteur IBPGR/ICRISAT de l'arachide (IBPGR, 1992) sont utilisés pour détecter la variabilité et identifier les cultivars étudiés.

Sur les quarante descripteurs étudiés, six descripteurs morphométriques (Mode d'embranchement, largeur de la gousse, longueur et la largeur de la graine, longueur et largeur de la foliole) et un descripteur agronomique (Teneur en huile) se sont avérés les plus discriminants car ils contribuent le plus dans la variabilité entre les accessions étudiées. Ainsi, la méthodologie suivie

pour la caractérisation morphologique est basée sur la réduction des variables présentant une association très forte à parfaite. Par conséquent, les traits qui présentent des constantes de similarités supérieures à 0,9 ont été éliminés. Selon Resende, (2007), les variables qui ont des corrélations génétiques très élevées peuvent être écartées car elles ne différencient pas entre les génotypes, ce qui s'applique également sur la corrélation phénotypique. De plus, dans une étude de la diversité génétique en utilisant des marqueurs morphologiques menée par Jorge et al., (2008) les traits ayant des indices de similarité supérieurs à 0,7 ont été éliminés afin d'éviter la redondance. De ce fait, deux caractères de l'ensemble des traits étudiés ont été éliminés. Ainsi, l'analyse des variances (ANOVA) pour les 13 caractères agronomiques montre une variation significative ($p < 0,001$) entre les accessions d'arachide.

Les coefficients de variation (CV) pour les variables quantitatives sont relativement élevés, les étendus sont larges pour la plupart des traits avec une variation significative pour tous les caractères étudiés. Les caractères les plus variables comprennent le poids de 10 gousses et 100 graines allant de 5,32 g à 20,92 g avec un CV de 42,53 %, et de 30,37 g à 108,4 g avec un CV de 40,12 % respectivement, ces résultats peuvent être attribués à l'importante variation observée sur la taille des graines et des gousses. D'autre part, la largeur et la longueur des folioles ont révélé des coefficients de variation similaires (19,23% et 19,43% respectivement) ainsi que des coefficients de corrélation positifs et importants confirmés par l'analyse des composantes principales. Une corrélation positive est notée également entre la teneur en huile et la largeur des graines. Cependant, ces caractères, en plus de la teneur en chlorophylle, présentent le coefficient de variation le plus petit (8,90%, 16,06% et 13,25% respectivement).

Les coefficients de corrélation de Pearson (Annexe 8 matrix de similarité) révèlent des associations entre les différents caractères agronomiques évalués. En général, les caractères architecturaux de la tige sont corrélés avec les caractères des graines et des gousses. Les coefficients de corrélation les plus élevés sont observés entre la longueur et la largeur des folioles ($r=0,751$, $p < 0,0001$) et le poids de 10 gousses et la largeur des graines ($r=0,776$, $p < 0,0001$). Néanmoins, une forte corrélation entre les caractères de maturité de la plante (le jour de première floraison et le jour de 50% de floraison) et le nombre de branches ainsi que le poids de 1000 graines a été rapporté par Yol et al., (2018). De plus, la longueur des graines et la longueur des gousses sont positivement corrélées ($r = 0,767$, $p < 0,0001$), par conséquent, toute restriction de la croissance des gousses entraîne des graines plus petites. Une faible corrélation est également observée entre la longueur de la feuille et la largeur de la plante ($r=0,456$, $p < 0,0001$), la teneur en huile et le poids de 10 gousses ($r=0,330$, $p < 0,0001$), ainsi qu'entre la hauteur de la tige principale et la largeur de la gousse ($r=0,302$, $p < 0,0001$).

L'analyse des composantes principales (ACP), montre que les sept premières composantes principales (CP) suffisent pour expliquer 64,03% de la variabilité totale entre les accessions étudiées. Ainsi, les deux premières CPs expliquent 17,174 % et 13,231 % de la variabilité totale, respectivement et confirme la relation entre les traits quantitatifs (coefficients de corrélation de Pearson). L'ACP a séparé les trente accessions selon la taille de leurs folioles grâce à la CP1 qui est représentée par les variables morphométrique relatives aux folioles de la plante. Cependant, la CP2 a séparé les cultivars selon la longueur de leurs graines, un caractère agronomique relative aux graines de l'arachide. Ces résultats sont appuyés par ceux de Katzamindis et al., (2006), qui montrent que les variétés botaniques d'*Arachis hypogaea* L sont classés en fonction des différences morphologiques des feuilles et des tiges. Cependant, Yol et al., (2018) ont rapporté que la première CP sépare les accessions selon le jour de leur première floraison, le jour de 50 % de floraison et le poids de 1000 graines. De plus, la deuxième composante sépare les accessions selon le nombre de gousse ainsi que le rendement par plante. Les auteurs ont révélé également une variabilité de 68,14% expliqué par les trois premières composantes principales, cette différence est principalement dû à l'utilisation d'un nombre plus faible de caractère dans cette étude (13 caractères, dont 8 caractères quantitatifs et 5 caractère qualitatifs) ainsi l'information de la diversité est répartie sur un nombre moins important de CPs et est condensé par conséquence dans les 3 premières CPs. Les résultats de l'ACP ont révélé aussi que la taille des folioles (longueur et largeur), la forme et la taille des graines, la teneur en huile et le mode d'embranchement sont les principaux caractères permettant de discriminer les accessions d'*A. hypogaea* étudiées. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par plusieurs auteurs (Mahalakshmi et al., 2005 ; Idi Garba et al., 2015 ; et Neya et al., 2017).

L'analyse des composantes principales a permis également de répartir les accessions sur trois groupes dont le premier est composé des accessions de la région côtière, le deuxième regroupe les accessions du nord saharien et le troisième groupe est composé des accessions de la région du centre saharien. Ainsi, les accessions de la région côtière sont caractérisées par un mode d'embranchement alterné et séquentiel avec des fleurs sur la tige principale, des graines de petite taille et des gousses plus large. Cependant, les accessions originaires du sud saharien se caractérisent par un mode d'embranchement irrégulier sans fleur sur la tige principale avec des graines et des gousses plus grandes. Enfin, le troisième groupe se caractérise par une petite taille des folioles avec des graines riche en huile. Etant donné que le mode d'embranchement représente un des traits qui permet la distinction entre les sous espèces *hypogaea* et *fastigiata* (Krapovickas & Gregory, 1994), les résultats de l'ACP peuvent être utilisée pour répartir la population étudiée en fonction des sous espèces. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yol et al., (2018) qui présente un regroupement

des accessions étudiées selon leur appartenance aux différentes sous-espèces par analyse des composantes principales.

Le dendrogramme généré par la méthode UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) a révélé des résultats proches de l'ACP, le dendrogramme répartie les accessions sur deux grands groupes dont le premier contient les accessions originaires de la région côtière (El Taref) et le deuxième est composé des accessions originaires de la région saharienne (Ghardaïa, El Oued et Adrar).

La distribution naturelle de la collection d'arachide étudiée sous divers condition agro-climatique dans le pays est le facteur le plus influassent de la variabilité morphologique, la fréquence d'apparition des traits étudiés est hétérogène, la pigmentation de la tige est le seul caractère à répartition égale entre les accessions (50% des accessions avaient des tiges non pigmentées, tandis que l'autre moitié avait des tiges pigmentées). En revanche, une prédominance très élevée a caractérisé certains traits tel que la forte densité des ramification (80%), la présence d'une à deux graines par gousse ainsi que l'inflorescence de type complexe (73,33%). Néanmoins, Yol et ses collaborateurs ont rapporté la prédominance du port érigé de la floraison (58,2%) et des tiges non pigmentées dans une collection de 156 génotypes d'arachide appartenant à l'espèce *A. hypogaea* Yol et al., (2018).

Généralement, les accessions originaires du sud (Ghardaïa, El Oued et Adrar) présentent une densité de ramification élevée et une texture grossière des gousses, ceci peut être dû à l'ensoleillement de la région du sud et au type de sol sableux et léger. Pareillement, plusieurs auteurs (Upadhyaya, 2003 ; Swamy et al., 2003 ; Canavar & Kaynak, 2010) ont rapporté que les accessions de la sous espèce *hypogaea* sont plus ramifiées que celles de la sous espèce *fastigiata*. De plus, la ramification de la plante d'arachide peut avoir un impact positif sur le rendement grâce au nombre de feuilles plus important porté par les ramifications en comparaison avec les autres accessions et l'augmentation consécutive de la surface de contact foliaire avec le soleil. Ainsi, les nœuds des branches sont des sites potentiels pour le développement des stolons et la formation des gousses (Konlan et al., 2013). En outre, les accessions sahariennes, notamment celles de Ghardaïa, présentent la hauteur de tiges principales la plus importante avec une moyenne de 46,78 cm par rapport aux accessions côtières qui se caractérisaient par des tiges plus petites (43,06 cm), ces observations concordent avec celles de Zhao et al., (2007) où la texture du sol était le principal facteur affectant la croissance des plantes d'haricots, l'étude a montré également que les plantes cultivées dans le loam et le sable étaient significativement plus grosses que celles cultivées dans l'argile (Lu et al., 2010).

La forme cylindrique des graines était un trait spécifique de toutes les accessions de Ghardaïa, les graines et les gousses de ces accessions sont par conséquent les plus longues de la collection, cela peut augmenter les chances d'obtenir des gousses avec de nombreuses graines et améliorer le rendement. En effet, les accessions originaires de Ghardaïa et de Adrar contiennent le plus souvent 3 graines que 2 contrairement aux accessions originaires d'El Taref qui présentent rarement des gousses à 3 graines.

La couleur du tégument est également un trait commercial important dont l'intensité peut varier en fonction de la maturité de la graine, de l'environnement, du génotype ou de l'interaction entre le génotype et l'environnement (Rao & Murty, 1994). Dans la présente étude une grande diversité de couleurs de tégument est observée. Le rose, le rouge, le beige et les nuances de ces couleurs sont généralement sélectionnés pour les industries des collations et des confiseries. Plusieurs génotypes de la collection étudiée présentent ces couleurs. Ainsi, le transfert de la couleur du tégument par hybridation est possible chez l'arachide (Branch, 2011), par conséquent, les génotypes avec la couleur du tégument souhaitable peuvent être utilisés comme parent dans les études de sélection et d'amélioration variétale.

La texture du sol est un facteur important de la productivité potentielle du sol (Lu et al., 2010), une étude présentée par Zhao et al., (2015) a révélé que le meilleur rendement d'arachide est obtenu dans les sols loameux et sableux contrairement à ceux contenant un grand pourcentage en argile. La texture du sol affecte également la capacité de nodulation de l'arachide. En effet, le sol sableux est le plus pauvre en matière organique et en éléments nutritifs tels que le phosphore et l'azote (Zhao et al., 2015), les racines des plantes de l'arachide développent par conséquent une forme de symbiose avec les bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium* sous forme de nodules racinaires fréquemment observés dans les sols sableux (Chevalier, 1934). Dans la présente étude, la plupart des accessions sahariennes présentent des nodules racinaires contrairement aux accessions originaires d'El Taref qui présentent des racines glabres.

Selon Krapovickas & Gregory, (1994) le port de la floraison et le mode d'embranchement sont les caractères les plus distinctifs entre les deux sous espèces *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* et *A. hypogaea* subsp. *fastigiata*. La sous-espèce *A. hypogaea hypogaea* se caractérise par un mode d'embranchement irrégulier avec l'absence des fleurs sur la tige principale et un port de floraison étalé. Cependant, la sous-espèce *hypogaea* subsp. *fastigiata* se caractérise par la présence de fleurs sur la tige principale avec un port de floraison érigé. En se basant sur les critères de cette classification, les accessions de la collection étudiée peuvent être divisées en deux groupes où le premier se compose des accessions de la région côtière appartenant à la sous-espèce *A. hypogaea*

fastigiata et le deuxième se compose des accessions de la région saharienne appartenant à la sous-espèce *A. hypogaea hypogaea*.

A l'exception de l'accession El Oued 03, les accessions originaires de la wilaya d'El Oued, présentent les caractères agronomiques et les caractères de maturité les plus intéressants. Grâce à la grande taille de leurs graines, les accessions d'El Oued sont les plus riches en matière grasse avec une moyenne de 48,31%. En plus de cela, ces accessions présentent le cycle de maturation le plus court qui varie entre 80 et 100 jours. Par conséquent, 50% des fleurs de ces accessions s'ouvrent entre 20 à 45 jours à partir du semis, ces caractères peuvent être dus aux conditions environnementales et la température de la région de culture (Rao & Murty, 1994 ; Craufurd et al., 2000) c'est ce qui explique que les accessions du sud arrivent à maturité avant celles de la région côtière. Toutefois, les différences taxonomiques affectent également la floraison de l'arachide, généralement les génotypes qui appartiennent à la subsp. *hypogaea* ont une maturité tardive par rapport à subsp. *fastigiata* (Mothilal, 2012). Pareillement, les résultats de Yol et al., (2018) rapportent que les accessions de la sous espèce *fastigiata* se caractérisent par une floraison précoce en comparant avec ceux de la sous espèce *hypogaea*, étant donné que l'influence de l'environnement est un facteur décisif dans la maturité des plantes (Upadhyaya et al., 2014). La différence observée entre les études antérieures et la présente étude peut être expliquée par l'influence de l'environnement saharien sur la maturité des accessions de la région du sud.

Les caractères agronomiques décrits précédemment font des accessions originaires d'El Oued la cible idéale pour les agriculteurs en raison de la grande taille de leurs graines, la courte durée de leur maturité et de leur forte teneur en huile. Ces résultats sont appuyés par ceux de Yol et al., 2018 qui ont effectué une analyse de la diversité génétique de 132 génotypes de la sous espèce *hypogaea* et 124 génotypes de la sous espèce *fastigiata* en utilisant des marqueurs agro-morphologiques, les résultats ont montré que les accessions appartenant à la sous espèce *hypogaea* présentent des caractères agronomiques plus intéressants que celles appartenant à la sous espèce *fastigiata*.

2. Etude de la diversité génétique en utilisant les marqueurs biochimiques

Les protéines de stockage des graines sont présentes sous la forme d'un ou plusieurs groupes de protéines en grandes quantités dans les graines pour fournir une réserve d'acides aminés à utiliser pendant la germination et la croissance des graines. La graine d'arachide contient 32 protéines différentes composées d'albumines et de globulines. Les protéines de stockage des graines sont principalement composées d'arachine, et de conarachine (viciline) - fractions I, II (Yamada et al., 1979 ; Liang et al., 2006). De nombreux articles ont mis en évidence la composition des protéines de stockage des graines (SSP) en utilisant une PAGE unidimensionnelle et bidimensionnelle (Krishna et al., 1986 ; Kottapalli et al., 2008). Ainsi, il a été démontré que l'électrophorèse dans les

conditions dénaturantes permet de séparer les sous unités des arachines (40,5, 37,5, 35,5 et 23,5 kDa) et des conarachines (61, 18, 17 et 15,5 kDa) (Prakash & Narasinga Rao, 1986).

Selon l'étude de Singh et al., (2018), les protéines de réserve des graines peuvent être utilisées comme des marqueurs potentiels de la diversité génétique et de discrimination entre les sous espèces et les variétés. Cependant, Bertozzo & Valls, (2001) ont étudié les protéines de réserve de 28 accessions appartenant aux espèces *A. pintoï* et *A. repens* par comparaison des profils électrophorétiques de la SDS-PAGE et de la native-PAGE où les résultats ont montré une diversité très faible entre les accessions des deux espèces étudiées. Par ailleurs, Kottapalli et al., (2008) n'ont rapporté aucune variation distincte entre quatre cultivars d'arachide appartenant à deux sous espèces différentes dans les profils d'électrophorèse monodimensionnelle contrairement à ceux de l'électrophorèse bidimensionnelle. De même, une faible diversité a été également enregistrée par analyse des profils électrophorétiques (SDS-PAGE) des protéines solubles de 151 accessions (Javaid et al., 2004). Toutefois, plusieurs récentes études ont rapporté une grande diversité sur les profils électrophorétiques des accessions étudiées, Masoomah et al., (2015) ont rapporté une grande diversité enregistrée sur 35 cultivars d'arachide. De même, Rao et al., (2013) ont enregistré une grande variation des bandes sur les profils électrophorétiques des accessions étudiées, la différence constante dans le profil protéique suggère que chaque espèce a un profil reproductible et stable en conséquence de son arrangement génétique spécifique (Ladizinsky & Hymowitz, 1979).

Dans la présente étude, une séparation des protéines de réserves des différentes accessions d'arachide sur un gel de polyacrylamide dans les conditions dénaturante (SDS-PAGE) est effectuée. Les profils électrophorétiques obtenus montrent la présence de 8 génotypes différents par le nombre de bandes, leurs mobilités relatives et leurs intensités.

En utilisant la SDS-PAGE, les protéines de réserve sont fractionnées en 30 bandes qui révèlent une hétérogénéité entre les accessions étudiées. Les différences concernent soit le nombre total de bandes présentes, leurs poids moléculaires (entre 6 à 250 kDa) ou leurs intensités à savoir des bandes denses, moyennes ou légères. Cette variation peut être due à l'adaptation des accessions aux facteurs éco-géographiques, à la richesse du sol en éléments nutritifs comme l'azote, et aux pratiques agronomiques de la région (Chowdhury et al., 2015).

Sur la base du nombre de bandes, les accessions sont groupées dans 2 grands clusters où le nombre de bandes présente dans chaque accession varie de 23 à 30 bandes. Ces résultats sont similaires à ceux de Rao et al., (2013) qui rapportent un profil électrophorétique caractérisé par un maximum de 28 bandes lors de la séparation des protéines de réserves solubles de 35 cultivars appartenant à la variété *Arachis hypogaea* par SDS-PAGE. En revanche, Singh et al., (2018) ont

rapporté un nombre plus faible de bande (entre 6 et 21 bandes), cette différence peut être due non seulement à l'origine géographique des accessions étudiées (présence des protéines d'adaptation aux conditions bioclimatique) mais aussi à la méthode d'extraction protéique adoptée dans chaque étude.

Selon les valeurs du Rf des bandes, ces dernières sont regroupées en quatre régions : région A (conarachine II), région B (arachine acide), région C (arachine basique) et région D (conarachine I). Aucune variation n'a été observée sur la région des arachines (de 20 kDa à 50 kDa) parmi les accessions étudiées. La deuxième fraction de globuline, représentée par les polypeptides de la conarachine, a été divisée en deux groupes de poids moléculaires différents (> 50 kDa pour la conarachine II, et < 20 kDa pour la conarachine I), où le profil électrophorétique présente des bandes similaires pour les conarachines II (région A) caractérisé par une protéine majeure de 61 kDa, cette bande correspond à l'un des allergènes majeur de l'arachide (Arah1).

Dans les profils d'électrophorèse, 7 bandes ont été identifiées dans la région D, parmi lesquelles la première et la deuxième sous-unité des conarachines I sont hautement polymorphes ; elles présentent respectivement un poids moléculaire de 20.2 kDa et 17.72 kDa pour la plupart des accessions, contrairement à 6 accessions de la collection d'El Taref et El Oued (Lamaissia 1, Lamaissia 2, Kala 3, El Oued 2, El Oued 3, et Boubeiadha 2) ayant des profils électrophorétiques dépourvus de ces bandes. En revanche, neuf accessions, dont, Chafia 1, Hiba 1, Sebseb 2, Metlili, El Mansoura et autres présentent ces sous-unités avec des poids moléculaires inférieurs (18.4 et 17.4, respectivement). Toutefois, l'accession Kala 4 a un profil spécifique qui ne présente que la sous-unité supérieure (20,2 kDa). Ces résultats, sont en accord avec ceux de Singh et al., (2018) qui montrent un grand polymorphisme dans la fraction des globulines ayant des poids moléculaires qui varient entre 28,10 kDa et 14,15 kDa. Liang et al., (2006) ont également révélé un grand polymorphisme pour la bande de 22 kDa par électrophorèse bidimensionnelle, les résultats ont montré plusieurs sous unités ayant des points isoélectriques distincts, ces dernières représentent des isoformes de l'allergène Arah 3 qui peuvent être modifiées par clivage post-traductionnel. Les résultats de cette étude ont suggéré également une relation entre ces isoformes de protéines de stockage polymorphes et les sous-espèces *fastigiata* et *hypogaea*.

Le dendrogramme basé sur l'analyse UPGMA à partir des profils protéiques a séparé toutes les accessions dans une plage de dissimilarité de 0 à 56,2 où deux groupes majeurs sont identifiés avec des sous-groupes ultérieurs. Ces résultats confortent ceux de l'ACP et confirment la présence de deux sous-espèces d'*Arachis hypogaea* dans la collection étudiée. Les résultats montrent également que les sous-unités protéiques de la conarachine I jouent un rôle crucial dans la discrimination de la sous-espèce *Arachis hypogaea*. De même, dans leur étude des fractions protéiques des graines

d'arachide pour des accessions et des espèces sauvages, Singh et al., (2018) ont rapporté le regroupement des accessions par la méthode UPGMA dans des clusters selon leurs appartenance aux sous espèces.

Une forte corrélation est notée entre la classification basée sur les caractères agromorphologiques et celle basée sur les protéines de réserve. En effet, les deux critères de classification regroupent les accessions originaires de la région côtière et celles originaires de la région saharienne dans des groupes distincts. Les deux classifications permettent également de distinguer entre les deux sous-espèces *hypogaea* et *fastigiata*. Néanmoins, l'augmentation du nombre d'accessions et de caractères étudiés est recommandée afin de supporter les résultats obtenus dans cette étude.

3. Etude de la diversité génétique en utilisant les marqueurs moléculaires

Les marqueurs morphologiques et biochimiques ont été utilisés par plusieurs auteurs (Neya et al., 2017 ; Kushwah et al., 2016 ; Aalami et al., 2007 ; Javaid et al., 2004 ; Upadhyaya, 2003 ; Bianchi-Hall et al., 1993) et restent un outil incontournable pour la caractérisation variétale et les études de diversité. Cependant, leur sensibilité aux variations environnementales accentue les cas d'homonymie et de synonymie entre les cultivars originaires de différentes régions et pays. Pour remédier à cela, la caractérisation morphologique est souvent appuyée par une étude de la diversité en moyennant des marqueur moléculaires (Wang et al., 2022 ; Mofokeng et al., 2021 ; Ren et al., 2014 ; Hong et al., 2010 ; Naito et al., 2008 ; Kottapalli et al., 2007 ; Tang et al., 2007 ; Hopkins et al., 1999). Plus récemment, des études morphologique et moléculaires ont été menées (Hong et al., 2021). Plusieurs marqueurs moléculaires RFLP, RAPD, AFLP et SSR ont été utilisés pour caractériser les germoplasmes de l'arachide dans le passé (Hilu & Stalker, 1995 ; Singh et al., 2002 ; Kochert et al., 1996 ; Subramanian et al., 2000 ; Dwivedi et al., 2001 ; He & Prakash, 2001 ; Herselman, 2003 ; Bravo et al., 2006 ; Koppulu et al., 2010) montrant un polymorphisme faible à modéré. D'autres études ont utilisé les marqueurs SSR pour différencier les variétés botaniques et les deux sous-espèces *hypogaea* et *fastigiata* (He et al., 2005 ; Liu et al., 2012 ; Xiong et al., 2013 ; Khera et al., 2013 ; Frimpong et al., 2015 ; Wang et al., 2016).

La diversité génétique des accessions locales d'arachide n'a fait l'objet d'aucune étude en Algérie. Le nom des cultivars est principalement basé sur l'origine du lieu de culture ce qui contribue à une identification erronée de la sous-espèce. Dans ce contexte, la présente étude a permis pour la première fois de lever le voile sur l'état de la diversité de cette espèce en Algérie moyennant une caractérisation moléculaire par l'utilisation de 11 marqueurs moléculaires de type SSR sur 30 cultivars représentés par 68 accessions d'arachide. Les indices de la diversité génétique obtenus dans le présent travail sont élevés ($He = 0,732$ et $PIC = 0,749$) par rapport aux études précédentes

où un plus grand nombre de marqueurs et d'accessions ont été utilisés. Par exemple, Wang et al., (2016) ont rapporté un He global de 0,48 et un PIC global de 0,429 dans différentes lignées d'arachides de la Chine, d'Inde et des États-Unis étudiées en utilisant 111 microsatellites. De même, Ren et al., (2014) ont enregistré une valeur de diversité génétique (He) de 0,11 et un PIC de 0,38 en analysant 196 accessions d'arachide plantées dans différentes régions de la Chine à l'aide de 146 marqueurs SSR. L'analyse d'une mini-core collection d'arachides par Wang et al., (2011) a montré un He de 0,59 et un PIC de 0,53. Varshney et al., (2009) ont analysé 189 accessions d'arachides représentant 29 pays et 10 régions géographiques en utilisant 25 marqueurs SSR et ont obtenu un PIC moyen de 0,70. De même, Barkley et al., (2007) ont enregistré un PIC de 0,687 lors de l'utilisation de 31 marqueurs SSR sur une mini collection de base des Etats-Unis. En revanche, plusieurs études (Varshney et al., 2009 ; Wang et al., 2011 ; Barkley et al., 2007) ont rapporté un nombre d'allèles par locus plus élevé (10,6, 8,1 et 15,4) par rapport à celui trouvé dans le présent travail (N=7,54). Le niveau élevé de diversité rapporté dans la présente étude peut être attribué à la forte valeur informative des marqueurs choisis. En effet, Varshney et al., (2009) ont rapporté que les marqueurs SSR polymorphes et la diversité des géotypes étudiés (différentes régions géographiques, types botaniques et statut biologique) augmentent le niveau de diversité génétique.

Le nombre d'allèles rares et uniques enregistré dans la présente étude (20 rares, 5 uniques) est moins important que ceux rapportés par Ren et al., (2014) et Wang et al., (2016) (86 allèles rares à 66 loci et 127 allèles rares parmi lesquels 59 étaient uniques à un géotype, respectivement). Ceci est en accord avec le nombre d'allèles par locus (N = 7,54) trouvé dans la présente étude contre 10,6, 8,1 et 15,4 dans les études de Varshney et al., 2009 ; Wang et al., 2011 ; Barkley et al., 2007, respectivement, cela pourrait être principalement dû à l'utilisation d'un nombre inférieur d'accessions dans cette étude (68 individus).

Un taux de mutation élevé au niveau des loci SSR pourrait également expliquer la présence de nombreux allèles rares (Henderson & Petes, 1992). Souvent, des allèles uniques pourraient indiquer la présence de géotypes particuliers dans une population et pourraient donc être un indicateur d'accessions potentielles avec des traits intéressants adaptés à l'amélioration des cultures (Boudchicha et al., 2018).

Au niveau de la population étudiée, le coefficient de consanguinité est négatif pour la population 'El Oued' bien qu'il présente une valeur proche de zéro pour les populations restantes ceci indique que les accessions d'arachide algérien ne sont pas soumises à une consanguinité intensive, probablement en raison de la culture généralisée d'un cultivar à multiplication végétative.

Certains allèles rares sont spécifiques à une population et peuvent par conséquent être utilisés pour les distinguer. Par exemple, l'allèle 282 bp (Lec1) s'est amplifié uniquement dans la population d'El Taref, cependant, l'allèle 283 bp du locus PM3 ne s'est pas amplifié dans la population d'El Taref et s'est amplifié dans les trois autres populations. Parmi les 20 allèles rares, 5 allèles uniques distinguaient 4 génotypes (Boumalek2, Tonga Ouest3, Kala32 et Lamaissia12). La présence d'allèles rares et uniques dans un génotype donné indique la nature diversifiée du génotype et peut donc être utile pour introduire la diversité dans les programmes de sélection variétale (Varshney et al., 2009).

L'analyse UPGMA a permis de discriminer 61 génotypes à partir de 68 accessions d'arachide. Certaines accessions présentent la même structure génétique (avec un coefficient de similarité=1) et sont donc considérées comme le même génotype, par exemple : Sebseb21 et Sebseb22, car ce sont des progéniteurs du même donneur.

L'arbre de l'UPGMA montre que les 68 accessions d'arachide algérien se répartissaient en deux grands groupes (I et II) a priori selon leur origine géographique : les accessions originaires de la wilaya d'El Taref de la région Nord et les accessions originaires de la wilaya de Ghardaïa, El Oued et Adrar de la région Sud, avec quelques exceptions (Berrihane1, Timimoune1 et Timimoune2). Il existe une grande similitude entre les résultats obtenus par la caractérisation morphologique (Djeghim et al., 2021) et ceux de la caractérisation moléculaire où les cultivars (Berrihane et Timimoune) ont été regroupés non pas en fonction de leur origine géographique mais en fonction de leur aspect morphologique suggérant que les cultivars de la région du Sud (Ghardaïa, El Oued et Adrar) avec le cultivar Berrihane1 appartiennent à la ssp. *hypogaea*. Alors que les cultivars du Nord (El Taref) avec les cultivars Timimoune 1 et Timimoune 2 appartiennent à la ssp. *fastigiata*. Cette conclusion est étayée par le fait que les deux accessions des cultivars Berrihane (Berrihane 1 et Berrihane 2) sont clairement différentes au niveau morphologique et moléculaire et constituent donc un cas d'homonymie. En fait, ils représentent deux sous-espèces différentes d'*A. hypogaea* cultivées dans la même région géographique.

La distance génétique (Gst, Nei, 1987) entre les populations montre que celles du Sud sont très proches les unes des autres et différentes de la population du Nord 'El Taref'. Cette dernière est proche de la population d'Adrar, principalement du fait de la présence des accessions Timimoune 1 et Timimoune 2 qui partagent la structure génétique des accessions d'El Taref en plus du faible nombre d'accessions prélevées dans cette population (10 accessions). Généralement, la valeur de la distance génétique entre les populations est faible et reflète la similitude génétique entre les populations.

Des résultats similaires sont observés dans des études antérieures, Ren et al., (2014) ont étudiés la répartition de 196 accessions d'arachide chinois. Ces dernières, ont été réparties sur trois régions écologiques où les sous-espèces sont regroupées dans une région spécifique. Mace et al., (2007) ont également remarqué un regroupement d'accessions d'origines géographiques similaires au sein des sous-espèces. Par ailleurs, dans l'étude de Varshney et al., (2009) le dendrogramme a montré qu'il n'y avait pas de regroupement significatif de génotypes en fonction de leur origine géographique et a conclu que les accessions étaient divisées selon leurs affiliations aux différentes sous-espèces.

Par ailleurs, les résultats obtenus par le clustering UPGMA sont cohérents avec ceux obtenus par l'analyse ACP et STRUCTURE. En effet, l'analyse ACP distingue trois groupes, les groupes A et B sont similaires à G1 et G2 dans le dendrogramme de l'UPGMA.

L'analyse bayésienne a été largement utilisée pour identifier tout regroupement hiérarchique dans une population. Dans ce travail, la valeur maximale de ΔK obtenue est de $K=2$, confortant les résultats fondés par le regroupement UPGMA et le regroupement ACP. Les accessions identifiées par STRUCTURE correspondent à celles obtenues par les analyses UPGMA et l'ACP regroupant les accessions selon leurs appartenances aux sous-espèces *hypogaea* et *fastigiata*. L'appartenance de 29 individus au cluster C1 est $\geq 0,7$, tandis que les accessions restantes (39) ont un coefficient d'appartenance $\geq 0,8$ pour le second cluster (C2). Les clusters générés par l'approche bayésienne sont identiques aux groupes UPGMA et ACP où l'accession « Berrihane1 » est classée avec les populations du Sud et les accessions « Timimoune1 » et « Timimoune2 » sont regroupées avec les accessions de la région Nord.

Le sous-clustering est effectué afin de ne pas sous-estimer la subdivision hiérarchique de la région sud en utilisant les mêmes conditions que le premier traitement des données, le résultat indique que les trois populations pourraient être divisées en trois sous-clusters (SC1, SC2 et SC3) avec un faible niveau de mélange (9 génotypes avec $Q \leq 70\%$). Les trois sous-groupes contiennent respectivement 11, 12 et 17 accessions. En fait, le groupe (G1) de l'arbre UPGMA et (A) de l'analyse ACP est divisé en deux sous-clusters (SC1 et SC2) selon l'analyse de structuration, tandis que le groupe (G2) de l'arbre UPGMA et (B) de l'analyse ACP correspondent au sous-groupe SC3 selon l'analyse de structuration, avec quelques exceptions qui consistent en des accessions qui présentent un mélange de pools génétiques : Sebseb11, Adrar21, Sebseb12, El Oued2, El Oued44, Hiba 23, Adrar23, Adrar22 et El Oued41 . Dans l'ensemble, aucun indice ne permet de juger que les accessions du sud sont regroupées en fonction de leurs sites de culture, elles sont donc dispersées dans différents groupes ce qui indique leur nature diversifiée (Varshney et al., 2009).

Dans la présente étude, l'analyse de l'AMOVA sans subdivision hiérarchique indique que la plupart de la variation génétique (supérieur à 90%) est observée entre les accessions étudiées. Cependant, seulement 8,9% de la variation est observée parmi les 4 populations investiguées, cette variation augmente à 10,3 lors de l'exécution d'AMOVA selon l'affiliation à la sous-espèce. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Varshney et al., (2009), qui montrent une majorité de variation génétique entre les individus au sein de chaque région géographique (98,5 %) et seulement 1,5 % de la variation génétique pour les individus entre les régions géographiques. Néanmoins, Ren et al., (2014) ont révélé que la variance génétique totale tenant en compte les origines géographiques étaient de 31 %, ce qui indique une différence entre les cultivars d'arachide originaires de la Chine.

Dans la présente étude, l'analyse des accessions d'arachide algérien indique qu'elles peuvent être distinguées sur la base de l'appartenance à la sous-espèce (ssp. *fastigiata* et ssp. *hypogaea*) plutôt que sur la base de la région géographique de leur culture.

4. Etude du pouvoir allergénique des accessions d'arachide

Il y a plus de cent ans, Von Pirquet, (1906) a introduit le terme d'allergie pour distinguer les réponses immunitaires nocives pour l'hôte d'un état physiologique d'immunité protectrice. La forme d'allergie la plus courante est l'hypersensibilité médiée par les IgE, cette dernière touche plus de 25 % de la population des pays industrialisés (Flöistrup et al., 2006). La réponse allergique est dirigée contre diverses protéines environnementales appelées allergènes (dont les protéines alimentaires) et se manifeste cliniquement par plusieurs symptômes qui peuvent arriver jusqu'à la mort.

Les protéines d'arachide sont considérées comme une source d'allergies graves à médiation IgE chez certaines personnes. En raison de la reconnaissance de l'arachide comme l'un des allergènes puissants, les noms de protéines immunologiques ont été désignées de Ara h 1 à Ara h 17 avec le préfixe Ara et des numéros différents (Singh et al., 2021). Bien que l'allergie à l'arachide soit un problème mondial très important, à ce jour aucune étude n'a été réalisée pour estimer la prévalence de cette allergie en Algérie ni pour évaluer l'allergénicité des variétés locales d'arachide. Dans le présent travail, des souris de souche BALB/c sont utilisées pour évaluer le potentiel allergénique de l'extrait protéique de six accessions d'arachides algérien choisies en se basant sur les résultats de la diversité génétique par différents marqueurs (résultats de la première partie du travail) afin de sélectionner les accessions les plus distinctes et éloignées génétiquement.

Le développement de modèles animaux, capables de produire des IgE ayant la même spécificité que les IgE humaines et développant des symptômes cliniques comparables à ceux observés chez les patients allergiques, présente un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction et la régulation de l'allergie alimentaire. Du fait des connaissances accumulées sur

la génétique et l'immunologie chez la souris, cette espèce animale a souvent été utilisée pour réaliser ce type d'études (Adel-Patient et al., 2005 ; Mine & Yang, 2007). Différentes souches de souris sont particulièrement utilisées en allergie, ainsi que différentes voies de sensibilisation expérimentales, notamment des sensibilisations par administration intragastrique combinée avec la toxine du choléra, mais également par injection intrapéritonéale combinée avec l'alum (hydroxyde d'aluminium) (Bodinier et al., 2008).

Il a été rapporté qu'il existe deux types de modèles murins, celui qui permet d'étudier la réponse immunitaire par induction des cellules immunitaires et/ou par la production des anticorps spécifiques et celui qui permet de mimer les symptômes anaphylactiques et la réaction inflammatoire locale (Schülke & Albrecht, 2019). Ainsi la réussite de la provocation est conditionnée par plusieurs paramètres à savoir la voie de sensibilisation, la dose, le nombre et la fréquence des sensibilisations, et enfin le choix de l'adjuvant (Li et al., 2000).

Le choix des souris Balb/c dans la présente étude est dû principalement à la grande capacité de cette souche à produire des anticorps spécifiques de type IgE et IgG, ce qui permet de mimer le phénotype atopique humain. Ces caractéristiques font des souris de souche Balb/c un choix très intéressant non seulement pour étudier la phase de sensibilisation aux allergènes (Dearman & Kimber, 2001), mais également la phase de déclenchement de la réaction allergique (Adel-Patient et al., 2003). Ainsi, plusieurs travaux ont favorisé l'utilisation de cette souche pour les études des allergies médiées par les IgE et des hypersensibilités (Kips et al., 2003 ; Zhou et al., 2016). Dearman et al., (2003) ont utilisé des souris BALB/c pour faire la distinction entre les protéines allergènes et les protéines qui, bien qu'immunogènes, n'ont pas le potentiel de provoquer une réaction allergique. Les résultats obtenus révèlent que le dosage des anticorps de type IgE pour des souris BALB/c peut être adopté comme un outil de discrimination entre les allergènes et les immunogènes. De même, Saldanha et al., (2004) ont sensibilisé les souris BALB/c par injection sous-cutanée de l'ovalbumine adsorbée sur l'hydroxyde d'aluminium (Alum) comme adjuvant. Les résultats rapportent que des souris sensibilisées à l'ovalbumine et exposées à long terme à cet antigène à faible dose par voie orale peuvent produire un taux élevé d'IgE et d'IgG1. Les résultats suggèrent également que ce modèle est fortement lié aux cytokines produites par les Th2. Cependant, malgré la publication de plusieurs travaux qui confirment que les souris Balb/c sensibilisées par voie orale constituent un modèle valable pour étudier les allergies alimentaires (Adel-Patient et al., 2005 ; Chang et al., 2013 ; Pablos-Tanarro et al., 2015 ; Orgel & Kulis, 2018), de nombreuses études ont montré que la sensibilité des souris BALB/c était facilement tolérée par l'introduction d'antigènes par voie gastro-intestinale, cette tolérance étant définie comme l'inhibition de la formation d'anticorps spécifiques après des immunisations parentérales ultérieures avec le même antigène (Weiner et al., 1994 ; Chen

et al., 1995 ; Weiner et al., 1997). En plus de cela, Dearman et al., (2002) ont comparé entre les deux voies d'introduction (la voie intrapéritonéale et la voie gastrointestinale) pour la production des anticorps IgG et IgE spécifiques à l'ovalbumine, les résultats ont montré que seule l'injection de l'ovalbumine par voie intrapéritonéale entraîne une forte production des anticorps IgE spécifique. Par conséquent, le modèle de souris BALB/c est plus adapté à l'injection intrapéritonéale pour déterminer l'allergénicité des protéines. A la lumière de ces résultats, et en raison de l'utilisation des protéines avec une allergénicité inconnue dans le présent travail (absence d'études antérieures sur l'allergénicité des variétés d'arachide Algérien) d'une part et l'interdiction de l'importation de la toxine du choléra utilisée comme adjuvant dans les protocoles de sensibilisation par voie orale de l'autre, nous avons opté pour le choix de la voie intrapéritonéale afin d'éviter de provoquer une tolérance dans le cas des protéines hypoallergéniques et de booster le système immunitaire.

L'évaluation de la réaction allergique induite chez les animaux peut être effectuée grâce à plusieurs paramètres tels que le dosage des anticorps spécifiques (IgE, IgG1 et IgG2a), le dosage des cytokines impliquées dans la réaction allergique (IL4, IL5 et l'interféron-gamma), le dosage de l'histamine, l'examen histologique et l'évaluation des symptômes anaphylactiques (Saldanha et al., 2004 ; Adel-Patient et al., 2005 ; Orgel & Kulis, 2018 ; Schülke & Albrecht, 2019). Plusieurs études aient rapporté que les souris Balb/c sont incapables de présenter des symptômes anaphylactiques lors d'un test de provocation de l'allergie (Schülke & Albrecht, 2019). Ainsi, Morafo et ses collaborateurs ont remarqué l'absence des symptômes anaphylactiques pour les souris Balb/c en comparaison avec ceux de la souche C3H/HeJ dans une étude de la susceptibilité génétique à l'allergie alimentaire pour les deux souches (Morafo et al., 2003). Contrairement à cela, Brandt et ses collègues ont rapporté que les souches de souris BALB/c et C57BL/6 couramment utilisées diffèrent fortement dans leur capacité à être sensibilisées à l'ovalbumine (Ova) lorsque les deux souches de souris sont sensibilisées avec l'ovalbumine adsorbée sur l'hydroxyde d'aluminium par deux injections intra-péritonéales. Les résultats obtenus ont montré que seules les souris BALB/c ont développé une diarrhée lors d'une provocation orale avec 50 mg d'Ovalbumine (Brandt et al., 2003). Arumugam et ses collègues ont également comparé des souris BALB/c à des souris 129ScEvBrd, les deux souches ont été sensibilisées par une seule injection de 50 µg de l'ovalbumine adsorbée sur l'hydroxyde d'aluminium par voie sous cutanée et provoquées 14 jours plus tard avec 50 mg d'Ovalbumine par voie orale (Arumugam et al., 2011). Les résultats ont montré que les souris 129ScEvBrd ont présenté une chute de température significative corrélée à un nombre plus élevé de mastocytes dans les tissus des souris 129ScEvBrd par rapport aux animaux BALB/c (Arumugam et al., 2011). Dans la présente étude, après provocation par 1 mg des protéines de l'arachide les souris Balb/c ont présenté des symptômes anaphylactiques à savoir une diarrhée et une perte de mobilité.

Ces différentes constatations peuvent être attribuées aux facteurs qui influencent la réponse immunitaire et la provocation de l'animal à savoir des facteurs micro-environnementaux (tels que l'alimentation, le microbiome et la qualité des allergènes) d'une part et des facteurs en relation avec l'animal (tels que la souche des souris, le sexe et l'âge des animaux, la voie de provocation, enfin la dose et la source des allergènes) (Kroghsbo et al., 2003 ; Bøgh et al., 2016 ; Schülke & Albrecht, 2019).

Dans la présente étude, un dosage des anticorps IgE, IgGt et IgG1 spécifiques aux protéines d'arachide est effectué par la technique ELISA de type indirect. Cette technique est la plus fréquemment utilisée en raison de sa grande précision, de sa facilité de manipulation et du bon potentiel de standardisation (Poms et al., 2004). Le résultat obtenu montre une augmentation progressive des niveaux d'anticorps IgGt avec les jours de sensibilisation jusqu'à la provocation pour tous les groupes sensibilisés. Ce résultat illustre l'efficacité du protocole d'immunisation utilisé dans cette étude. Il a été démontré que les modèles murins possèdent un mécanisme de système immunitaire similaire à celui de l'homme, en particulier pour les réponses Th1 et Th2 (Stavnezer, 1996 ; McKenzie et al., 1999).

L'anaphylaxie systémique chez la souris peut être médiée en grande partie par l'IgG1 et le récepteur Fc γ RIII (Miyajima et al., 1997). Dans notre étude, des niveaux élevés de la sous-classe IgG1 sont enregistrés pour tous les groupes sensibilisés. Dans l'anaphylaxie systémique médiée par les IgG1, les antigènes peuvent former des complexes avec des IgG1 spécifiques, les macrophages où les basophiles peuvent capturer efficacement les complexes IgG1-allergènes via le récepteur Fc γ RIII exprimé à leur surface. Suite à cette liaison, les macrophages et/ou les basophiles libèrent le facteur d'activation plaquettaire (PAF) lors de la stimulation avec le complexe IgG1- allergène qui réticulent les cellules à récepteur (Humphrey et al., 1982 ; Tsujimura et al., 2008). Conformément à ce qui précède, le lot n°2 (sensibilisé avec l'extrait protéique de l'accession Lamaissia 01) présente le niveau le plus élevé d'IgG1 le jour de provocation (jour 35), les souris appartenant à ce groupe manifestent plusieurs symptômes anaphylactiques et démontrent ainsi une capacité significative des protéines de l'accession Lamaissia 01 à produire des symptômes anaphylactiques. En revanche, les souris des groupes 5 et 6 (sensibilisées avec l'extrait protéique des accessions El Frin et Timimoune, respectivement) présentent les niveaux les plus faible en IgG1. Ces résultats, sont en accord avec les scores enregistrés pour les symptômes anaphylactiques ce qui élucide la faible capacité des protéines de ces accessions à induire une réaction anaphylactique.

Les souris, comme les êtres humains, peuvent présenter une réaction IgE/Fc ϵ RI/mastocytes qui peut médier une réponse gastro-intestinale anaphylactique (Chen et al., 2017). Des lésions intestinales graves sont associées à des signes cliniques d'anaphylaxie systémique. En effet, lorsque

le jéjunum n'est pas enflammé, les cellules épithéliales jéjunales et le mésentère sont complets et les villosités intestinales sont bien visibles. La structure jéjunale et les villosités intestinales seront détruites suite à une inflammation, pouvant même entraîner la disparition des villosités intestinales (Noti et al., 2014).

Dans la présente étude, comparée à des souris naïves, la structure jéjunale des souris des groupes sensibilisés montre des degrés différents de dommage et d'infiltration des cellules inflammatoires après sensibilisation à l'aide des protéines des différentes accessions d'arachide. La plupart des coupes histologiques montrent une atrophie des villosités (Groupe 1, 2 et 3) avec une réduction considérable du rapport villosité /crypte, ceci est dû à une hyperplasie de la crypte causée par l'infiltration des cellules inflammatoires. Ces observations expliquent les diarrhées observées lors du test de provocation (jour 35). De plus, la coupe histologique de tissu jéjunal du groupe 3 est caractérisée par un élargissement villositaire. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études publiées qui ont montré que l'allergie alimentaire chez la souris est caractérisée par une atrophie des villosités et une hyperplasie des cellules caliciformes, ainsi que par une infiltration des mastocytes IgE positifs effectuant une dégranulation dans le jéjunum et une libération accrue d'histamine (Sun et al., 2008 ; Huang et al., 2010 ; Chen et al., 2011 ; Grar et al., 2015).

Etant donné que l'IgG1 à activité anaphylactique nécessite des taux élevés de l'IL-4 produite par des cellules de type Th2 (Faquim-Mauro et al., 1999), les résultats décrits précédemment appuyés par l'examen histologique illustrent une réponse Th2/IL-4 élevée par les souris de notre modèle animal. De même, selon Cardoso et al., (2009), les souris C57BL/6 de type sauvage (WT) avec une déficience en interleukine 4 (IL-4^{-/-}) sensibilisées aux protéines d'arachide ont préservé l'intégrité intestinale sans aucun signe d'inflammation des muqueuses. Ces animaux ont présenté des niveaux accrus d'IgG2a dans les sérums démontrant l'orientation Th1 du système immunitaire.

Malgré l'importance des IgG1 et des cytokines dans la réaction allergique, les anticorps IgE jouent un rôle primordial dans la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine. La capacité différentielle des protéines d'arachide à induire la production d'anticorps IgE reflète leur potentiel allergénique. Les concentrations d'anticorps IgE sont mesurés par la technique ELISA de type indirect pour chaque jour de sensibilisation. Les résultats rapportent une augmentation significative des anticorps IgE après la deuxième sensibilisation (jour 21) par rapport au groupe naïf ($p < 0,05$ test de Dunnett). De même, Adel-Patient et ses collègues ont présenté une concentration élevée d'anticorps IgE après la deuxième administration de WPPE (Whole Protein Peanut Extract) sur des souris Balb/c par voie intra péritonéale (Adel-Patient et al., 2005).

Différents titres d'IgE sont enregistrés le jour du test de provocation. Ainsi, tous les groupes de souris révèlent une concentration d'anticorps IgE significativement élevée par rapport au groupe témoin à l'exception du groupe 6 qui présente la plus faible concentration d'IgE avec une différence non significative par rapport au groupe témoin ($312,39 \pm 57,11$ ng/ml, $p > 0,05$). Les résultats obtenus montrent ainsi le pouvoir allergénique des extraits protéiques et permettent d'effectuer une classification des accessions étudiées en fonction de leur pouvoir allergénique selon les titres d'IgE enregistrés, les observations histologiques et les symptômes anaphylactiques comme suit : Timimoune < El Oued 01 < El Frin < Sebseb 01 < Berrihane 01 < Lamaissia 01. Sur la base de ces résultats, on peut conclure que les accessions appartenant à la sous-espèce *A. hypogaea fastigiata* sont plus allergéniques que celles appartenant à la sous-espèce *A. hypogaea hypogaea*. En revanche, Pandey et al., (2019) ont quantifié les cinq allergènes majeurs (Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, et Ara h 8) d'une collection de 96 accessions appartenant à la sous-espèce *A. hypogaea hypogaea* et 148 accessions d'arachide appartenant à la sous-espèce *A. hypogaea fastigiata*, les résultats rapportent que les accessions attribuées à la *ssp hypogaea* étaient plus allergéniques que les accessions de la *ssp fastigiata*, cette divergence peut s'expliquer par la diversité génétique et géographique des accessions étudiées qui induit des modifications protéiques et génère un impact substantiel sur la conformation spatiale des protéines et la liaison avec les récepteurs immunitaires spécifiques (Bøgh et al., 2016). De plus, Mondoulet, (2005) a rapporté un risque d'effet dénaturant des différents solvants utilisés au cours du protocole de l'extraction des protéines tels que l'hexane utilisé pour la dilapidation de la farine d'arachide. Par ailleurs, le choix et la composition du tampon d'extraction jouent un rôle très important dans le rendement de l'extraction. Ainsi, un mauvais choix du tampon peut conduire à une estimation erronée de la quantité des protéines dont les allergènes dans chaque accessions et/ou affecter la conformation tri-dimensionnelle des protéines extraites ce qui peut influencer par conséquent l'immunoréactivité de cette dernière avec les différentes classes d'anticorps.

Conclusion et
perspectives

Conclusion et perspectives

L'identification et la caractérisation des ressources locales d'arachide est un enjeu majeur qui permet non seulement la réhabilitation, la valorisation et la protection de cette ressource, mais constitue également une première étape dans les études de l'allergénicité par un tamisage des accessions identiques et similaires.

Le présent travail tente à résoudre deux problèmes à impact socioéconomique dont le premier concerne la sécurité alimentaire et le deuxième concerne la santé du citoyen. Grâce à une étude complète de la diversité génétique en moyennant différents marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires, les résultats obtenus dans cette thèse ont permis d'effectuer une caractérisation précise des variétés d'arachides algériennes permettant ainsi de participer à des programmes de sélection et d'amélioration variétale. Dans la deuxième partie du travail nous avons levé le voile sur un problème de santé publique qui est l'allergie à l'arachide où, à l'aide d'un modèle de souris allergiques, les accessions d'arachide algériens ont été classées selon leur pouvoir allergénique et les accessions hypoallergéniques ont été identifiées pour favoriser leur utilisation dans les industries alimentaires.

La première partie de ce travail qui s'intéresse à l'étude du polymorphisme des accessions d'arachide algérien provenant de différentes régions en Algérie nous a permis d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés au début de notre projet à savoir la détermination des marqueurs les plus discriminants pour l'identification et l'affiliation des cultivars aux différents groupes et sous espèces d'une part et la détection des accessions qui présentent des traits agronomiques intéressants de l'autre. Au cours de ces travaux de recherche, nous avons constaté la présence de deux sous-espèces dans notre collection grâce à l'identification des cultivars qui présentent les deux traits spécifiques de chaque sous-espèce. La collection des cultivars a été par la suite examinée pour 36 caractères agro-morphologiques supplémentaires où les caractères liés aux feuilles, aux graines, au mode d'embranchement de la plante et à la teneur des graines en huile ont été identifiés pour leur pouvoir discriminant. Ces derniers, peuvent aider à établir une bonne gestion des collections regroupant un grand nombre d'accessions.

L'analyse phylogénétique des accessions nous a permis non seulement de regrouper les accessions selon leur appartenance aux différents sous-groupes et régions géographiques, mais a fait aussi ressortir les accessions d'El Oued dans un groupe caractérisé par les meilleurs traits à intérêt agronomique à savoir la grande taille des graines, la richesse en matière grasse et la courte période de maturité.

Dans une seconde partie, nous avons confirmé et appuyé les résultats obtenus de la diversité agromorphologique par une analyse des protéines de réserve et une étude moléculaire. Ainsi, l'analyse des profils électrophorétiques nous a permis de mettre en évidence le rôle crucial des conarachines I dans l'identification des génotypes. Par ailleurs les résultats de la diversité génétique en fonction des marqueurs moléculaires viennent confirmer ceux de l'étude morphologique et biochimique par une répartition des accessions selon leur affiliation aux sous-espèces où les accessions du sud (El Oued, Ghardaïa et Adrar) à l'exception des accessions Timimoune 1 et Timimoune 2 appartiennent à la *spp hypogaea* et les accessions de la région côtière (El Taref) à l'exception de l'accession Berrihane 1 appartiennent à la *spp fastigiata*. De plus, l'étude moléculaire a décelé un cas de synonymie entre les accessions Berrihane 1 et Berrihane 2 qui malgré leur appellation identique appartiennent à deux sous-espèces différentes. L'analyse du coefficient de consanguinité au niveau des quatre populations étudiées a permis de révéler que les accessions d'arachide algériennes présentent un excès d'hétérozygotie et donc une faible consanguinité entre les cultivars et un grand flux de gènes.

Au cours de l'analyse moléculaire, nous avons constaté la présence de plusieurs allèles caractéristiques dans une seule population on peut citer l'allèle 282 et 229 pb du locus Lec1 qui caractérisent la population d'El Taref, l'allèle 205 pb du locus Ah4-26 qui caractérise la population de Ghardaïa, les allèles 195 et 245 pb du locus Ah3 et PM3 respectivement qui caractérisent la population d'El Oued. Enfin, les allèles 170 et 172 pb du locus S31 qui caractérisent la population Adrar. La présence de ces allèles indique la nature diversifiée des génotypes qui peuvent être utiles pour introduire la diversité dans les programmes de sélection et d'amélioration variétale.

Enfin, on peut conclure que l'analyse de la diversité génétique de cette collection de l'espèce *Arachis hypogaea* en Algérie est prometteuse compte tenu des résultats du polymorphisme obtenu dans la présente étude. Cette dernière doit donc être prise en compte dans les programmes d'innovation variétale à la recherche des caractères à intérêt agronomique.

Parallèlement à ce premier volet du travail, nous avons valorisé les résultats de la diversité génétique dans une deuxième partie qui s'intéresse à l'étude du pouvoir allergénique des accessions d'arachide algérien grâce à un modèle de souris Balb/c allergique aux arachides que nous avons adapté. Le suivi de la réponse immunitaire au cours de la période de sensibilisation par le dosage sérique des différentes classes d'anticorps nous a permis de confirmer l'efficacité du protocole de sensibilisation ainsi qu'en témoignent les signes cliniques enregistrés lors du test de provocation et l'examen histologique des coupes jéjunales. Par ailleurs, les résultats nous ont permis d'effectuer une classification des accessions étudiées en fonction de leur pouvoir à produire une réponse allergique où les accessions de la région côtière (El Taref) étaient les plus allergéniques

contrairement à celles de la région du sud qui ont manifesté un caractère hypoallergénique. Ces résultats nous en conduits à conclure que les accessions appartenant à la sous espèce *fastigiata* sont plus allergéniques que celles de la sous espèce *hypogaea*.

Au cours des différentes parties de cette thèse, les accessions de la région du sud (en particulier celles d'El Oued) ont figuré comme celles qui présentent les meilleures caractéristiques de la collection étudiée tant sur le plan agronomique qu'allergique, nous suggérons ainsi de prêter plus d'intérêt aux accessions de cette région et de favoriser leurs cultures sur des superficies plus larges.

Sur le plan national l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, reste judicieuse à concrétiser :

- ✓ L'utilisation d'un nombre d'individus plus élevé provenant des régions non échantillonnées dans le but d'identifier toutes les espèces et sous espèces cultivées en Algérie.
- ✓ L'augmentation du nombre de marqueurs ce qui permettrait de réaliser d'autres applications comme la recherche des gènes candidats liés à la résistance aux stressés biotiques et abiotiques.
- ✓ L'identification de tous les cultivars d'arachide cultivés en Algérie, permettant la création d'une collection de référence pour une meilleure gestion des collections existantes et la conservation de la diversité pour des programmes d'amélioration futurs.
- ✓ Etudier les allergies croisées avec l'arachide.
- ✓ Etudier les liens entre la diversité des accessions et les conditions éco-géographiques des régions de culture.
- ✓ Identifier et caractériser les différents allergènes de l'arachide par l'approche protéomique.
- ✓ Etudier les caractéristiques de la liaison entre les allergènes de l'arachide et les IgE des sujets allergiques.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

.A.

- Aalami**, A., ESFAHANI, M., ABD ELAHI, M. B., & Mozafari, J. (2007). Assessment of genetic diversity in groundnut (*Arachis hypogea* L.) germplasm using morphological traits. *Iranian journal of crop sciences*, 4 (32), 357-367.
- Abdellaziz**, R., Malki, G., & Douagui, H. (2014). Prévalence des allergies alimentaires chez les enfants et adolescents scolarisés dans la région ouest de la Wilaya d'Alger. *Revue Française d'Allergologie*, 54(3), 230. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2014.02.014>.
- Adel-Patient**, K., Bernard, H., Ah-Leung, S., Creminon, C., & Wal, J. M. (2005). Peanut-and cow's milk-specific IgE, Th2 cells and local anaphylactic reaction are induced in Balb/c mice orally sensitized with cholera toxin. *Allergy*, 60(5), 658-664. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00767.x>.
- Adel-Patient**, K., Nahori, M. A., Proust, B., Lapa e Silva, J. R., Creminon, C., Wal, J. M., & Vargaftig, B. B. (2003). Elicitation of the allergic reaction in β -lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: biochemical and clinical manifestations differ according to the structure of the allergen used for challenge. *Clinical & Experimental Allergy*, 33(3), 376-385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01613.x>.
- Agabriel**, C., Ghazouani, O., Birnbaum, J., Liabeuf, V., Porri, F., Gouitaa, M., Cleach, I., Grob, J.J., Bongrand, P., Sarles, J., & Vitte, J. (2014). Ara h 2 and Ara h 6 sensitization predicts peanut allergy in Mediterranean pediatric patients. *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(7), 662-667. <https://doi.org/10.1111/pai.12299>.
- Al-Saghir**, M. G., & Abdel-Salam, A. S. G. (2015). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogea* L.) cultivars as revealed by RAPD markers. *American Journal of Plant Sciences*, 6(14), 2303. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.614233>.
- Amri-Tiliouine**, W., Ounane, S. M. (2018). Diversité des rhizobiums nodulants l'arachide (*Arachis hypogaea* L.) en Algérie. Congrès national sur les ressources phytogenétiques en Algérie : Evaluation, Valorisation Et Conservation- 22, 23 et 24 octobre 2018. At : INRAA, El Harrach, Alger.
- Arif**, I. A., Khan, H. A., Shobrak, M., Al Homaidan, A. A., Al Sadoon, M., Al Farhan, A. H., & Bahkali, A. H. (2010). Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the Arabian Oryx. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 259-265. <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr714>.
- Armour**, J. A. L., Alegre, S. A., Miles, S., Williams, L. J., Badge, R. M., Goldstein, D. B., & Schlotterer, C. (1999). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 24–33.
- Arumugam**, M., Ahrens, R., Osterfeld, H., Kottyan, L. C., Shang, X., Maclennan, J. A., ... & Hogan, S. P. (2011). Increased susceptibility of 129SvEvBrd mice to IgE-Mast cell mediated anaphylaxis. *BMC immunology*, 12(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-14>.

Ashok Kumar, C. (2004). A diversity analysis of early-maturing groundnut germplasm using SSR markers (Doctoral dissertation, Acharya NG Ranga Agricultural University).

Ayabe, T., Satchell, D. P., Wilson, C. L., Parks, W. C., Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (2000). Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature immunology*, 1(2), 113-118. <https://doi.org/10.1038/77783>.

.B.

Barcaccia, G. (2010). Molecular markers for characterizing and conserving crop plant germplasm. In *Molecular techniques in crop improvement* (pp. 231-254). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2967-6_10.

Barkley, N. A., Dean, R. E., Pittman, R. N., Wang, M. L., Holbrook, C. C., & Pederson, G. A. (2007). Genetic diversity of cultivated and wild-type peanuts evaluated with M13-tailed SSR markers and sequencing. *Genetics Research*, 89(2), 93-106. <https://doi.org/10.1017/S0016672307008695>.

Barkley, N. A., Upadhyaya, H. D., Liao, B., & Holbrook Corley, C. (2016). Global Resources of Genetic Diversity in Peanut. In *Peanuts: Genetics, Processing, and Utilization*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-63067-038-2.00003-4>.

Barre, A., Borges, J.-P., Culerrier, R., & Rougé, P. (2005). Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes. *Immunology Letters*, 100(2), 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.03.014>.

Bednorz, L., Myczko, L., & Kosinski, P. (2004). Isozyme polymorphism and genetic structure of the population of *Sorbus torminalis* (L.) Crantz from the Bytyń Forest (Poland). *Journal of Applied Genetics*, 45(3), 321–324. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15306723/>

Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10(2), 77-81.

Bennetzen, J. L. (2000). Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: microcolinearity and its many exceptions. *The Plant Cell*, 12(7), 1021-1029. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.7.1021>.

Bensalem-Bendjelloul, M. (1998). *Techniques histologiques : théorie et pratique*. Office des publications universitaires.

Bernard, H., Mondoulet, L., Drumare, M. F., Paty, E., Scheinmann, P., Thai, R., & Wal, J. M. (2007). Identification of a new natural Ara h 6 isoform and of its proteolytic product as major allergens in peanut. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(23), 9663-9669. <https://doi.org/10.1021/jf071424g>.

Bernhisel-Broadbent, J., & Sampson, H. A. (1989). Cross-allergenicity in the legume botanical family in children with food hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 83(2), 435-440. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(89\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0091-6749(89)90130-9).

- Bertoza, M. R., & Valls, J. F. M.** (2001). Seed storage protein electrophoresis in *Arachis pintoi* and *A. repens* (Leguminosae) for evaluating genetic diversity. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48(2), 121-130. <https://doi.org/10.1023/A:1011272009831>.
- Besler, M.** (2001). Determination of allergens in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(11), 662-672. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00119-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00119-4).
- Beyer, K., Morrow, E., Li, X. M., Bardina, L., Bannon, G. A., Burks, A. W., & Sampson, H. A.** (2001). Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(6), 1077-1081. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.115480>.
- Bianchi-Hall, C. M., Keys, R. D., Stalker, H. T., & Murphy, J. P.** (1993). Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (*Arachis*, Fabaceae) species. *Plant systematics and evolution*, 186(1), 1-15 <https://doi.org/10.1007/BF00937710>.
- Blanc, F.** (2008). Développement d'un modèle cellulaire de déclenchement de la réaction allergique. Applicatifs à l'étude des allergènes du lait et de l'arachide, et évaluation de l'effet de traitements thermiques sur l'allergénicité de Ara h 1 (Doctoral dissertation, AgroParisTech).
- Blin, A.** (2019). Les adjuvants vaccinaux. *Actualités Pharmaceutiques*, 58(584), 52-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actpha.2019.01.020>.
- Bodinier, M., Leroy, M., & Adel-Patient, K.** (2008). Modèles animaux d'allergie alimentaire. Application aux protéines de blé. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 48(8), 526-532. <https://doi.org/10.1016/j.allerg.2008.09.001>.
- Boettcher, E., & Crowe, S. E.** (2013). Dietary Proteins and Functional Gastrointestinal Disorders. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(5), 728–736. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.97>.
- Bøgh, K. L., van Bilsen, J., Głogowski, R., López-Expósito, I., Bouchaud, G., Blanchard, C., ... & O'mahony, L.** (2016). Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of food allergens in animal models. *Clinical and translational allergy*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0110-2>.
- Bohra, A., Jha, R., Pandey, G., Patil, P. G., Saxena, R. K., Singh, I. P., Singh, D., Mishra, R.K., Singh, F., Varshney, R.K & Singh, N. P.** (2017). New hypervariable SSR markers for diversity analysis, hybrid purity testing and trait mapping in Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *Frontiers in plant science*, 8, 377. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00377>.
- Bonin, A., Ehrich, D., & Manel, S.** (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular ecology*, 16(18), 3737-3758. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03435.x>.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314-331.
- Bouakkadia, H., Boutebba, A., Haddad, I., Vinh, J., Guilloux, L., Sutra, J. P., Sénéchal, H., & Poncet, P.** (2015, November). Analyse immunoprotéomique des allergènes non-hydrosolubles de farines de

quatre légumineuses : arachide, soja, sésame et lentille. In *Annales de Biologie Clinique*, 73(6), 690-704. <https://doi.org/10.1684/abc.2015.1089>.

Boudchicha, R. H., Hormaza, J. I., & Benbouza, H. (2018). Diversity analysis and genetic relationships among local Algerian fig cultivars (*Ficus carica* L.) using SSR markers. *South African journal of botany*, 116, 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.015>.

Boudraa, G. (2015). Allergies alimentaires chez l'enfant. XIIème Congrès de Pédiatrie, SPO.

Branch, W. D. (2011). First 100 Years—Inheritance of Testa Color in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Crop science*, 51(1), 1-4. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.06.0349>.

Brandt, E. B., Strait, R. T., Hershko, D., Wang, Q., Muntel, E. E., Scribner, T. A., ... & Rothenberg, M. E. (2003). Mast cells are required for experimental oral allergen-induced diarrhea. *The Journal of clinical investigation*, 112(11), 1666-1677. <https://doi.org/10.1172/JCI19785>.

Bravo, J. P., Hoshino, A. A., Angelici, C. M. L. C., Lopes, C. R., & Gimenes, M. A. (2006). Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 29(3), 516-524.

Brown, W. L. (1983). Genetic diversity and genetic vulnerability—an appraisal. *Economic botany*, 37(1), 4-12. <https://doi.org/10.1007/BF02859301>.

Brusic, V., Millot, M., Petrovsky, N., Gendel, S. M., Gigonzac, O., & Stelman, S. J. (2003). Allergen databases. *Allergy*, 58(11), 1093-1100. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00248.x>.

Burks, A. W., Shin, D., Cockrell, G., Stanley, J. S., Helm, R. M., & Bannon, G. A. (1997). Mapping and mutational analysis of the IgE-binding epitopes on Ara h 1, a legume vicilin protein and a major allergen in peanut hypersensitivity. *European journal of biochemistry*, 245(2), 334-339. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00334.x>.

Burks, A. W., Williams, L. W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. J., & Helm, R. M. (1992). Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 90(6), 962-969. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(92\)90469-I](https://doi.org/10.1016/0091-6749(92)90469-I).

Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G., & O'Brien, T. (1991). Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(2), 172-179. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(91\)90325-i](https://doi.org/10.1016/0091-6749(91)90325-i).

.C.

Cabanos, C., Urabe, H., Tandang-Silvas, M. R., Utsumi, S., Mikami, B., & Maruyama, N. (2011). Crystal structure of the major peanut allergen Ara h 1. *Molecular Immunology*, 49(1-2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.08.004>.

Canavar, Ö., & Kaynak, M. A. (2010). Growing degree day and sunshine radiation effects on peanut pod yield and growth. *African Journal of Biotechnology*, 9(15), 2234-2241.

- Cardoso, C. R.,** Provinciatto, P. R., Godoi, D. F., Ferreira, B. R., Teixeira, G., Rossi, M. A., ... & Silva, J. S. (2009). IL-4 regulates susceptibility to intestinal inflammation in murine food allergy. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(3), G593-G600. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90431.2008>.
- Carvalho, S.B.,** Velo-Antón, G., Tarroso, P., Portela, A.P., Barata, M., Carranza, S., Moritz, C., & Possingham, H.P. (2017) Spatial conservation prioritization of biodiversity spanning the evolutionary continuum. *Nature Ecology & Evolution*, 1(6), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0151>.
- Cavaillon, J. M.,** Marie, C., Caroff, M., Ledur, A., Godard, I., Poulain, D., ... & Haeffner-Cavaillon, N. (1996). CD14/LPS receptor exhibits lectin-like properties. *Journal of Endotoxin Research*, 3(6), 471-480. <https://doi.org/10.1177/096805199600300605>.
- Cebra, J. J.** (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition*, 69(5), 1046s-1051s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.5.1046s>.
- Chang, L.,** Sampson, H. A., & Masilamani, M. (2013). Oral Sensitization to Peanut in Balb/c Mice Is Enhanced by Dietary Elimination of Soybean Components-towards a Better Mouse Model for Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(2), AB218. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1447>.
- Chatel, J. M.,** Bernard, H., & Orson, F. M. (2003). Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *International archives of allergy and immunology*, 131(1), 14-18. <https://doi.org/10.1159/000070429>.
- Chen, C.,** Lianhua, L., Nana, S., Yongning, L., & Xudong, J. (2017). Development of a BALB/c mouse model for food allergy: comparison of allergy-related responses to peanut agglutinin, β -lactoglobulin and potato acid phosphatase. *Toxicology research*, 6(2), 251-261. <https://doi.org/10.1039/c6tx00371k>.
- Chen, X. W.,** Lau, K. W. K., Yang, F., Sun, S. S. M., & Fung, M. C. (2011). An adjuvant free mouse model of oral allergenic sensitization to rice seeds protein. *BMC gastroenterology*, 11(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-62>.
- Chen, Y.,** Inobe, J. I., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V. K., & Weiner, H. L. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, 376(6536), 177-180. <https://doi.org/10.1038/376177a0>.
- Chevalier A.** Monographie de l'Arachide (Suite). *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*. 1934; 14(156):565-632. <https://doi.org/10.3406/jatba.1934.5400>.
- Chowdhury, F. N.,** Hossain, D., Hosen, M., & Rahman, S. (2015). Comparative study on chemical composition of five varieties of groundnut (*Arachis hypogaea*). *World J. of Agricultural Science*, 11(5), 247-254. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjas.2015.11.5.1864>.
- Clark, L. V.,** & Schreier, A. D. (2017). Resolving microsatellite genotype ambiguity in populations of allopolyploid and diploidized autopolyploid organisms using negative correlations between allelic variables. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 1090-1103. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12639>.

- Collard, B. C., & Mackill, D. J.** (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1491), 557-572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2170>.
- Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K.** (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1), 169-196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>.
- Connors, L., & Wasserman, S.** (2010). Food allergy—the nuts and bolts. Parkhurst Exchange, 18.
- Couderc, J. J., Rearte, D. H., Schroeder, G. F., Ronchi, J. I., & Santini, F. J.** (2006). Silage chop length and hay supplementation on milk yield, chewing activity, and ruminal digestion by dairy cows. *Journal of dairy science*, 89(9), 3599-3608. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72399-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72399-2).
- Coujard, R., Poirier, J., & Racadot, J.** (1980). Précis d'histologie humaine. Presses Université Laval.
- Cox, A. L., & Nowak-Wegrzyn, A.** (2018). Innovation in Food Challenge Tests for Food Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*, 18(12). <https://doi.org/10.1007/s11882-018-0825-3>.
- Craufurd, P. Q., Wheeler, T. R., Ellis, R. H., Summerfield, R. J., & Prasad, P. V.** (2000). Escape and tolerance to high temperature at flowering in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *The Journal of Agricultural Science*, 135(4), 371-378. <https://doi.org/10.1017/S0021859699008394>
- Cuc, L. M., Mace, E. S., Crouch, J. H., Quang, V. D., Long, T. D., & Varshney, R. K.** (2008). Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *BMC plant biology*, 8(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-55>.

.D.

- De Carvalho Moretzsohn, M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Kresovich, S., Valls, J. F. M., & Ferreira, M. E.** (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-11>.
- De Martinville, B., Wyman, A. R., White, R., & Francke, U.** (1982). Assignment of first random restriction fragment length polymorphism (RFLP) locus ((D14S1) to a region of human chromosome 14. *American journal of human genetics*, 34(2), 216.
- De Vrese, M., Keller, B., & Barth, C. A.** (1992). Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase (EC 3.2. 1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*, 67(1), 67-75. <https://doi.org/10.1079/BJN19920009>.
- Dearman, R. J., & Kimber, I.** (2001). Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicology letters*, 120(1-3), 181-186. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00276-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00276-4).
- Dearman, R. J., Caddick, H., Stone, S., Kenna, J. G., Basketter, D. A., & Kimber, I.** (2002). Immunogenic properties of rapidly digested food proteins following gavage exposure of mice: a

comparison of ovalbumin with a potato acid phosphatase preparation. *Food and chemical toxicology*, 40(5), 625-633. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00132-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00132-6).

Dearman, R. J., Skinner, R. A., Herouet, C., Labay, K., Debruyne, E., & Kimber, I. (2003). Induction of IgE antibody responses by protein allergens: inter-laboratory comparisons. *Food and chemical toxicology*, 41(11), 1509-1516. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(03\)00167-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(03)00167-4).

Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3), 297-302.

Djeghim, H., Bellil, I., & Khelifi, D. (2021). Genetic diversity of the Algerian peanut population analyzed using morphological markers and seed storage proteins. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*, 182(3), 111-124. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2021-3-111-124>.

Dominguez-Garcia, M. C., Laib, M., de la Rosa, R., & Belaji, A. (2012). Characterisation and identification of olive cultivars from North-eastern Algeria using molecular markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(2), 95–100. <https://doi.org/10.1080/14620316.2012.11512837>.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.

Dreborg, S., & Foucard, T. (1983). Allergy to apple, carrot and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*, 38(3), 167-172.

Duarte, J., Caridade, M., & Graca, L. (2011). CD4-blockade can induce protection from peanut-induced anaphylaxis. *Frontiers in immunology*, 2, 56. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00056>.

Dubcovsky, J., Ramakrishna, W., SanMiguel, P. J., Busso, C. S., Yan, L., Shiloff, B. A., & Bennetzen, J. L. (2001). Comparative sequence analysis of colinear barley and rice bacterial artificial chromosomes. *Plant physiology*, 125(3), 1342-1353. <https://doi.org/10.1104/pp.125.3.1342>.

Dwivedi, S. L., Gurtu, S., Chandra, S., Yuejin, W., & Nigam, S. N. (2001). Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm. I: RAPD analysis. *Plant Breeding*, 120(4), 345-349. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2001.00613.x>.

.E.

Eagles, H. A., Bariana, H. S., Ogonnaya, F. C., Rebetzke, G. J., Hollamby, G. J., Henry, R. J., Henschke, P. H & Carter, M. (2001). Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(12), 1349-1356. <https://doi.org/10.1071/AR01067>

Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.

Ellegren, H. & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17, 422–433. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.58>.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.

.F.

Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>.

FAO (2021) Food and Agricultural Organization of the United Nations, FAO Statistical, Consulter le 29, mars 2020, Database. <http://faostat.fao.org>

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT database. <http://faostat.fao.org/> (accessed 08.10.2020).

Faquim-Mauro, E. L., Coffman, R. L., Abrahamsohn, I. A., & Macedo, M. S. (1999). Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3572-3576.

Ferguson, M. E., Burow, M. D., Schulze, S. R., Bramel, P. J., Paterson, A. H., Kresovich, S., & Mitchell, S. (2004). Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 108(6), 1064-1070. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1535-2>.

Fernández, A., & Krapovickas, A. (1994). Cromosomas y evolucion en "*Arachis* (leguminosae)". *Bonplandia*, 187-220.

Feuille, E., & Nowak-Wegrzyn, A. (2018). Allergen-specific immunotherapies for food allergy. *Allergy, asthma & immunology research*, 10(3), 189-206. <https://doi.org/10.4168/air.2018.10.3.189>.

Finkelman, F. D. (2010). Peanut allergy and anaphylaxis. *Current opinion in immunology*, 22(6), 783-788. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.005>.

Flinterman, A. E., Van Hoffen, E., den Hartog Jager, C. F., Koppelman, S., Pasmans, S. G., Hoekstra, M. O., Bruijnzeel-Koomen, C.A., Knulst, A.C & Knol, E. F. (2007). Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(8), 1221-1228. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02764.x>.

Flöistrup, H., Swartz, J., Bergström, A., Alm, J. S., Scheynius, A., van Hage, M., ... & Parsifal Study Group. (2006). Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.09.039>.

Foligne, B., Senegas-Balas, F., Cursio, R., Cayuela, C., Antoine, J. M., Rolf-Petersen, N., & Balas, D. (2003). Consequences of Adrenalectomy on Small Intestine Trophic Parameters in Aged and Young Rats: Evidence of Defective Adaptation by Aging and Lack of Corticoids. *Digestive diseases and sciences*, 48(6), 1147-1158. <https://doi.org/10.1023/A:1023733216568>.

Fortun-Lamothe, L., & Boullier, S. (2004, September). Interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity, and strategies to improve digestive health in young rabbits. In Proc.: 8th World Rabbit Congress (pp. 7-10).

Froidure, A., & Pilette, C. (2015). Les cellules dendritiques humaines dans l'asthme et la rhinite allergique. *médecine/sciences*, 31(2), 151-158. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153102011>.

.G.

Galli, S. J., & Tsai, M. (2010). Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European journal of immunology*, 40(7), 1843-1851. <https://doi.org/10.1002/eji.201040559>.

Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. (1963). The classification of allergic reactions underlying disease. In: Coombs, R.R.A., Gells, P.G.H. (Eds.), *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell, Oxford.

Gimenes, M. A., Hoshino, A. A., Barbosa, A. V., Palmieri, D. A., & Lopes, C. R. (2007). Characterization and transferability of microsatellite markers of the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*). *BMC Plant Biology*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-9>.

Gimenes, M. A., Lopes, C. R., & Valls, J. F. (2002). Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 349-353. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300017>.

Giuffrè, A. M., Tellah, S., Capocasale, M., Zappia, C., Latati, M., Badiani, M., & Ounane, S. M. Seed oil from ten Algerian peanut landraces for edible use and biodiesel production. *Journal of oleo science*. 2016, 65(1), 9-20. <https://doi.org/10.5650/jos.ess15199>.

Goldman, A. S. (2000). Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *The Journal of nutrition*, 130(2), 426S-431S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.426S>.

Goldstein, D. B., & Pollock, D. D. (1997). Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *Journal of heredity*, 88(5), 335-342. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023114>.

Goole, J., Deleuze, P., Vanderbist, F., & Amighi, K. (2008). New levodopa sustained-release floating minitablets coated with insoluble acrylic polymer. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 68(2), 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.017>.

Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology*, 8(3), 205-217. <https://doi.org/10.1038/nri2273>.

Gould, H. J., Sutton, B. J., Bevil, A. J., Bevil, R. L., McCloskey, N., Coker, H. A., Fear, D., & Smurthwaite, L. (2003). The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annual review of immunology*, 21(1), 579-628. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141103>.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genetics research international*, 431-487. <https://doi.org/10.1155/2015/431487>.

- Grar**, H., Dib, W., El Mecherfi, K. E., Negaoui, H., Gourine, H., Benattia, S. B., ... & Saidi, D. (2015). Supplementation with β -carotene or vitamin E protects against increase in anaphylactic response in β -lactoglobulin-sensitized Balb/c mice: ex vivo study. *European Food Research and Technology*, 241(3), 393-398. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2471-5>.
- Gregory**, W.C., Krapovickas, A., Gregory, M.P., 1980. Structure variation, evolution, and classification in *Arachis*. In: Summerfield, R.J., Bunting, A.H. (Eds.), *Advances in Legume Science*. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 469–481.
- Grundy**, J., Matthews, S., Bateman, B., Dean, T., & Arshad, S. H. (2002). Rising prevalence of allergy to peanut in children: data from 2 sequential cohorts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110(5), 784-789. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128802>.
- Guo**, B., Liang, X., Chung, S. Y., Holbrook, C. C., & Maleki, S. J. (2008). Proteomic analysis of peanut seed storage proteins and genetic variation in a potential peanut allergen. *Protein and Peptide Letters*, 15(6), 567-577. <https://doi.org/10.2174/092986608784966877>
- Gupta**, R. K., & Siber, G. R. (1995). Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 13(14), 1263-1276. <https://doi.org/10.1016/0264410X95000110>.

.H.

- Halward**, T. M., Stalker, H. T., Larue, E. A., & Kochert, G. (1991). Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germ-plasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome*, 34(6), 1013-1020. <https://doi.org/10.1139/g91-156>.
- Hamilton**, R. G., & Oppenheimer, J. (2015). Serological IgE analyses in the diagnostic algorithm for allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 3(6), 833-840. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.08.016>.
- Hammond**, R. L., Saccheri, I. J., Ciofi, C., Coote, T., Funk, S. M., McMillan, W. O., Bayes, M. K., Taylor, E., Bruford, M.K. (1998). Molecular tools for screening biodiversity. Isolation of microsatellite markers in animals. In: Karp A., Issac P. G., Ingram D. S., editors. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. London, UK: Chapman & Hall, pp. 279–287. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6_51.
- Hansen**, J. S., Alberg, T., Rasmussen, H., Lovik, M., & Nygaard, U. C. (2011). Determinants of experimental allergic responses: interactions between allergen dose, sex and age. *Scandinavian journal of immunology*, 73(6), 554-567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02529.x>.
- Hardacre**, A. K., Nicholson, H. F., & BOYCE, M. P. (1984). A portable photometer for the measurement of chlorophyll in intact leaves. *New Zealand journal of experimental agriculture*, 12(4), 357-362. <http://doi.org/10.5897/AJAR2013.8364>.
- He**, G., & Prakash, C. (2001). Evaluation of genetic relationships among botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) using AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48(4), 347-352. <https://doi.org/10.1023/A:1012019600318>.
- He**, G., and S. Prakash. (1997). Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*A. hypogaea* L.). *Euphytica*. 97, 143-149. <https://doi.org/10.1023/A:1002949813052>.

- He, G., Meng, R., Gao, H., Guo, B., Gao, G., Newman, M., ... & Prakash, C. S.** (2005). Simple sequence repeat markers for botanical varieties of cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 142(1), 131-136. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1043-3>.
- He, G., Meng, R., Newman, M., Gao, G., Pittman, R. N., & Prakash, C. S.** (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC plant biology*, 3(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-3>.
- Hellman, L. T., Akula, S., Thorpe, M., & Fu, Z.** (2017). Tracing the Origins of IgE, Mast Cells, and Allergies by Studies of Wild Animals. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01749>.
- Henderson, S. T., & Petes, T. D.** (1992). Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(6), 2749-2757. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.6.2749>.
- Herselman, L.** (2003). Genetic variation among Southern African cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes as revealed by AFLP analysis. *Euphytica*, 133(3), 319-327. <https://doi.org/10.1023/A:1025769212187>.
- Hilu, K. W., & Stalker, H. T.** (1995). Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): Evidence from RAPDs. *Plant Systematics and Evolution*, 198(3), 167-178. <https://doi.org/10.1007/BF00984735>.
- Hilu, K. W., Friend, S. A., Vallanadu, V., Brown, A. M., Hollingsworth IV, L. R., & Bevan, D. R.** (2019). Molecular evolution of genes encoding allergen proteins in the peanuts genus *Arachis*: Structural and functional implications. *PLoS one*, 14(11), e0222440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222440>.
- Hoelzel, A. R.** (1998). *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford, UK: IRL Press, pp. 237–261.
- Hoffmann, A., Griffin, P., Dillon, S., Catullo, R., Rane, R., Byrne, M., Jordan, R., Oakeshott, J., Weeks, A., Joseph, L., Lockhart, P., Borevitz, J., & Sgrò, C.** (2015). A framework for incorporating evolutionary genomics into biodiversity conservation and management. *Climate Change Responses*, 2, 1. <https://doi.org/10.1186/s40665-014-0009-x>.
- HogenEsch, H.** (2002). Mechanisms of stimulation of the immune response by aluminum adjuvants. *Vaccine*, 20, S34-S39. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00169-X).
- Hong, Y., Chen, X., Liang, X., Liu, H., Zhou, G., Li, S., ... & Guo, B.** (2010). A SSR-based composite genetic linkage map for the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genome. *BMC Plant Biology*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-17>.
- Hong, Y., Pandey, M. K., Lu, Q., Liu, H., Gangurde, S. S., Li, S., ... & Chen, X.** (2021). Genetic diversity and distinctness based on morphological and SSR markers in peanut. *Agronomy Journal*, 113(6), 4648-4660. <https://doi.org/10.1002/agj2.20671>.
- Hopkins, M. S., A. M. Casa, T. Wang, S. E. Mitchell, R. E. Dean, G. D. Kochert, and S. Kresovich.** (1999). Discovery and characterization of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in peanut. *Crop Sci.* 39, 1243-1247. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900040047x>.

- Hould**, René. (1984). Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Décarie éditeur: Montréal.
- Hourihane**, J. O. B., Berger, A., Roberts, S. A., & Warner, J. O. (1998). Resolution of peanut allergy: case-control study. *Science commentary: Why do some children grow out of peanut allergy?*. *Bmj*, 316(7140), 1271-1275. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7140.1271>.
- Huang**, J., Liu, C., Wang, Y., Wang, C., Xie, M., Qian, Y., & Fu, L. (2018). Application of *in vitro* and *in vivo* models in the study of food allergy. *Food Science and Human Wellness*, 7(4), 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.10.002>.
- Huang**, Q., Xu, H., Yu, Z., Gao, P., & Liu, S. (2010). Inbred Chinese Wuzhishan (WZS) minipig model for soybean glycinin and β -conglycinin allergy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 5194-5198. <https://doi.org/10.1021/jf904536v>.
- Hubisz**, M. J., Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources*, 9(5), 1322-1332. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>.
- Humphrey**, D. M., McManus, L. M., Satouchi, K., Hanahan, D. J., & Pinckard, R. N. (1982). Vasoactive properties of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and analogues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 46(4), 422-427.
- Husted**, L. (1936). Cytological Studies an the Peanut, *Arachis*. II Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. *Cytologia*, 7(3), 396-423.

.I.

- IBPGR**, I. (1992). Descriptors for groundnut. Rome, Italy and Patancheru, AP, India: Int. Board of Plant Genetic Resources and Int. Crops Res. Inst. For the Semi-Arid Tropics.
- Idi Garba**, N. M., Bakasso, Y., Atta, S., Mamane, M. I., Adamou, M., Hamidou, F., Sani IDI, S., Mahamane, A., & Zaman-Allah, M. (2015). Evaluation of agro-morphological diversity of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in Niger. . *African Journal of Agricultural Research*, 10(5), 334-344. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8364>.
- Ito**, K., Inagaki-Ohara, K., Murosaki, S., Nishimura, H., Shimokata, T., Torii, S., ... & Yoshikai, Y. (1997). Murine model of IgE production with a predominant Th2-response by feeding protein antigen without adjuvants. *European journal of immunology*, 27(12), 3427-3437. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271243>.

.J.

- Jacobson**, A., & Hedrén, M. (2007). Phylogenetic relationships in *Alisma* (Alismataceae) based on RAPDs, and sequence data from ITS and trn L. *Plant systematics and evolution*, 265(1), 27-44. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0514-x>.

- James, J. M., Kagey-Sobotka, A., & Sampson, H. A.** (1993). Patients with severe atopic dermatitis have activated circulating basophils. *Journal of allergy and clinical immunology*, 91(6), 1155-1162. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(93\)90318](https://doi.org/10.1016/0091-6749(93)90318).
- Javaid, A., Ghafoor, A., & Anwar, R.** (2004). Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. *Pakistan Journal of Botany*, 36(1), 25-30.
- Jiang, G. L.** (2013). Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. *Plant breeding from laboratories to fields*, 45-83. <https://doi.org/10.5772/52583>.
- Jin, T., Guo, F., Chen, Y., Howard, A., & Zhang, Y.-Z.** (2009). Crystal structure of Ara h 3, a major allergen in peanut. *Molecular Immunology*, 46(8-9), 1796–1804. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.023>.
- Johnston, L. K., Chien, K. B., & Bryce, P. J.** (2014). The Immunology of Food Allergy. *The Journal of Immunology*, 192(6), 2529–2534. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303026>.
- Jorge, M. A. B., Van de Wouw, M., Hanson, J., & Mohammed, J.** (2008). Characterisation of a collection of buffel grass (*Cenchrus ciliaris*). *Tropical Grasslands*, 42(1), 27.

.K.

- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., & Dhawan, A. K.** (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>.
- Kan, W., Sharma, K. K., & Bhatnagar-Mathur, P.** (2006). Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Agrobacterium Protocols*, 343(2), 347–358. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:347>.
- Karp, A., Edwards, K. J., Bruford, M., Funk, S., Vosman, B., Morgante, M., Seberg, O., Kremer, A., Boursot, P., Arctander, P., Tautz, D., & Hewitt, G. M.** (1997a). Molecular technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and challenges: New technologies for detecting variation in dna complement traditional methods in biodiversity. *Nature Biotechnology*, 15(7), 625–628. <https://doi.org/10.1038/nbt0797-625>.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G., Hodgkin, T.** (1997b). Molecular tools in plant genetics resources conservation: a guide to the technologies. *Technical Bulletin n°. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy (Issu 2)*.
- Khera, P., Upadhyaya, H. D., Pandey, M. K., Roorkiwal, M., Sriswathi, M., Janila, P., ... & Varshney, R. K.** (2013). Single nucleotide polymorphism–based genetic diversity in the reference set of peanut (*Arachis spp.*) by developing and applying cost-effective kompetitive allele specific polymerase chain reaction genotyping assays. *The plant genome*, 6(3), 1-11. <http://dx.doi.org/10.3835/plantgenome2013.06.0019>.
- Kips, J. C., Anderson, G. P., Fredberg, J. J., Herz, U., Inman, M. D., Jordana, M., ... & Chung, K. F.** (2003). Murine models of asthma. *European Respiratory Journal*, 22(2), 374-382. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00026403>.

- Kleber-Janke, T., Cramer, R., Appenzeller, U., Schlaak, M., & Becker, W. M. (1999).** Selective cloning of peanut allergens, including profilin and 2S albumins, by phage display technology. *International archives of allergy and immunology*, 119(4), 265-274. <https://doi.org/10.1159/000024203>.
- Knauff, D. A., & Gorbet, D. W. (1989).** Genetic diversity among peanut cultivars. *Crop Science*, 29(6), 1417-1422. <https://doi.org/10.2135/cropsci1989.0011183X002900060017x>.
- Kochert, G., Halward, T., Branch, W. D., & Simpson, C. E. (1991).** RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(5), 565-570. <https://doi.org/10.1007/BF00226719>.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgano, L., Lopes, C. R., & Moore, K. (1996).** RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 83(10), 1282-1291. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13912.x>.
- Konlan, S., Sarkodie-Addo, J., Asare, E., Kombiok, JM. (2013).** Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) varietal response to spacing in the Guinea savannah agro-ecological zone of Ghana: growth and yield. *African journal of agricultural research*. 8(22):2769-2777. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1313>.
- Koppelman, S. J., Knol, E. F., Vlooswijk, R. A. A., Wensing, M., Knulst, A. C., Hefle, S. L., Gruppen, H & Piersma, S. (2003).** Peanut allergen Ara h 3: isolation from peanuts and biochemical characterization. *Allergy*, 58(11), 1144-1151. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2003.00259.x>.
- Koppelman, S. J., Vlooswijk, R. A. A., Knippels, L. M. J., Hessing, M., Knol, E. F., Van Reijssen, F. C., & Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M. (2001).** Quantification of major peanut allergens Ara h 1 and Ara h 2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*, 56(2), 132-137. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.056002132.x>.
- Koppelman, S. J., Wensing, M., Ertmann, M., Knulst, A. C., & Knol, E. F. (2004).** Relevance of Ara h1, Ara h2 and Ara h3 in peanut-allergic patients, as determined by immunoglobulin E Western blotting, basophil-histamine release and intracutaneous testing: Ara h2 is the most important peanut allergen. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(4), 583-590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.1923.x>.
- Koppolu, R., Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Hoisington, D. A., & Varshney, R. K. (2010).** Genetic relationships among seven sections of genus *Arachis* studied by using SSR markers. *BMC Plant Biology*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-15>.
- Kottapalli, K. R., Burow, M. D., Burow, G., Burke, J., & Puppala, N. (2007).** Molecular characterization of the US peanut mini core collection using microsatellite markers. *Crop Science*, 47(4), 1718-1727. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.06.0407>.
- Kottapalli, K. R., Payton, P., Rakwal, R., Agrawal, G. K., Shibato, J., Burow, M., & Puppala, N. (2008).** Proteomics analysis of mature seed of four peanut cultivars using two-dimensional gel electrophoresis reveals distinct differential expression of storage, anti-nutritional, and allergenic proteins. *Plant Science*, 175(3), 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.005>.

- Kotzamanidis, S. T., Stavropoulos, N., & Ipsilandis, C. G.** (2006). Classification and evaluation of Greek groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using 17 main agronomic and quality traits. *Pakistan Journal of Biological Science*, 9(6), 1021-1027. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.1021.1027>.
- Krapovickas, A.** (1968). Origen, Variabilidad y Diffusion del Mani (*Arachis hypogaea*). *Actas Y Memorias Cong. Inter. Americanistas* 2, 517–534. Buenos Aires. Eng. tr., The Origin, Variability and Spread of the Groundnut (*Arachis hypogaea*). In: Ucko, P.J., Falk, I.S. (Eds.), 1969, The Domestication and Exploitation of Plants and Animals. Gerald Duckworth Co., Ltd., London, pp. 427–441.
- Krapovickas, A., and W. Gregory.** (1994). Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8: 1-186. <http://www.jstor.org/stable/41941177>.
- Kremer, A.** (2000). Changements climatiques et diversité génétique. *Revue Forestière Française*.
- Krishna, T. G., Pawar, S. E., & Mitra, R.** (1986). Variation and inheritance of the arachin polypeptides of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 73(1), 82-87.
- Kroghsbo, S., Christensen, H. R., & Frøkiær, H.** (2003). Experimental parameters differentially affect the humoral response of the cholera-toxin-based murine model of food allergy. *International archives of allergy and immunology*, 131(4), 256-263. <https://doi.org/10.1159/000072137>.
- Kumar, L. S.** (1999). DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology advances*, 17(2-3), 143-182. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00018-4).
- Kushwah, A., Gupta, S., Sharma, S. R., & Kaur, K.** (2016). Study on genetic diversity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using morphological and molecular markers. *Supplement on Genetics and Plant Breeding*, 11(4):3105-3109.

.L.

- Lachaux, A., Bouvier, R., Cozzani, E., Loras-Duclaux, I., Kanitakis, J., Chevallier, M., & Kaiserlian, D.** (1994). Familial autoimmune enteropathy with circulating anti-bullous pemphigoid antibodies and chronic autoimmune hepatitis. *The Journal of pediatrics*, 125(6), 858-862. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(05\)81999-7](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(05)81999-7).
- Ladizinsky, G., & Hymowitz, T.** (1979). Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54(4), 145-151.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Laikre, L.** (2010) Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conservation Genetics*, 11, 349–354. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0037-4>.
- Lamireau, T., & Enaud, R.** (2020). Les nouvelles formes d'allergie. *Alimentaire*, n° 244, 8–11.
- Lanham, P. G., S. Fennell, J. P. Moss, and W. Powell.** (1992). Detection of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic DNAs. *Genome* 35, 885-889. <https://doi.org/10.1139/g92-134>.

- Larché, M., Akdis, C. A., & Valenta, R. (2006).** Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 761–771. <https://doi.org/10.1038/nri1934>.
- Lauer, I., Dueringer, N., Pokoj, S., Foetisch, K., Reese, G., Malet, A., Cistero-Bahima, A., Enrique, E., Vieths, S., Scheurer, S. (2008).** Peanut lipid transfer protein (Ara h 9): expression, characterisation and its biological activity in comparison to the peach LTP, Pru p 3 279. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 63(88).
- Lee, L. A., & Burks, A. W. (2006).** Food allergies: prevalence, molecular characterization, and treatment/prevention strategies. *Annual review of nutrition*, 26. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.26.061505.111211>.
- Lefebvre, V., & Chèvre, A. M. (1995).** Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. *Agronomie*, 15(1), 3-19. <https://doi.org/10.1051/agro:19950101>.
- Lehmann, K., Schweimer, K., Reese, G., Randow, S., Suhr, M., Becker, W.-M., Vieths, S., Rösch, P. (2006).** Structure and stability of 2S albumin-type peanut allergens: implications for the severity of peanut allergic reactions. *Biochemical Journal*, 395(3), 463–472. <https://doi.org/10.1042/bj20051728>.
- Lehrer, S. B., Horner, W. E., Reese, G., & Taylor, S. (1996).** Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(6), 553-564. <https://doi.org/10.1080/10408399609527739>.
- Li, X. M., Serebrisky, D., Lee, S. Y., Huang, C. K., Bardina, L., Schofield, B. H., ... & Sampson, H. A. (2000).** A murine model of peanut anaphylaxis: T-and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1), 150-158. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107395>.
- Li, Y., Chen, C. Y., Knapp, S. J., Culbreath, A. K., Holbrook, C. C., & Guo, B. (2011).** Characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and genetic relationships within cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Peanut Science*, 38(1), 1-10. <https://doi.org/10.3146/PS10-10.1>.
- Liang, X. Q., Luo, M., Holbrook, C. C., & Guo, B. Z. (2006).** Storage protein profiles in Spanish and runner market type peanuts and potential markers. *BMC Plant Biology*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-24>.
- Lieberman, J. A., Glaumann, S., Batelson, S., Borres, M. P., Sampson, H. A., & Nilsson, C. (2013).** The utility of peanut components in the diagnosis of IgE-mediated peanut allergy among distinct populations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 1(1), 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2012.11.002>.
- Litt, M., & Luty, J. A. (1989).** A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 397–401.
- Liu, K., & Muse, S. V. (2005).** PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21(9), 2128-2129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>.

- Liu, L. F., Cui, S. L., Chen, H. Y., & Wei, X. Y. (2012).** Studies on genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties bred in Hebei, Shandong and Henan provinces. *Journal of Plant Genetic Resources*, 13(2), 201-206.
- Liu, X., Feng, J., Xu, Z. R., Wang, Y. Z., & Liu, J. X. (2008).** Oral allergy syndrome and anaphylactic reactions in BALB/c mice caused by soybean glycinin and β -conglycinin. *Clinical & Experimental Allergy*, 38(2), 350-356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02893.x>.
- Lu H.D., Xue J.Q., Ma G.S., Hao Y.C., Zhang R.H., Ma X.F.** Soil physical and chemical properties and root distribution in high yielding spring maize fields in Yulin. Shaanxi Province. *Chinese Journal of Applied Ecology*. 2010; 21(4):895-900.

.M.

- Macdougall, C. F., Cant, A. J., & Colver, A. F. (2002).** How dangerous is food allergy in childhood? The incidence of severe and fatal allergic reactions across the UK and Ireland. *Archives of disease in childhood*, 86(4), 236-239. <https://doi.org/10.1136/adc.86.4.236>.
- Mace, E. S., Phong, D. T., Upadhyaya, H. D., Chandra, S., & Crouch, J. H. (2006).** SSR analysis of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to rust and late leaf spot diseases. *Euphytica*, 152(3), 317-330. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9218-0>.
- Mace, E. S., Yuejin, W., Boshou, L., Upadhyaya, H. D., Chandra, S., & Crouch, J. H. (2007).** Simple sequence repeat (SSR)-based diversity analysis of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm resistant to bacterial wilt. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 5(1), 27-36. <http://doi.org/10.1017/S1479262107390916>.
- Madhumati, B. (2014).** Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis. *Int. J. Pure App. Biosci*, 2(1), 169-188.
- Mahalakshmi, P., Manivannan, N., & Muralidharan, V. (2005).** Genetic divergence of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm. *Legume Research-An International Journal*, 28(3), 220-222.
- Maleki, S. J., Viquez, O., Jacks, T., Dodo, H., Champagne, E. T., Chung, S. Y., & Landry, S. J. (2003).** The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(1), 190-195. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1551>.
- Mallikarjuna, N and Varshney, R K (2014)** Genetics, Genomics and Breeding of Peanut: An Introduction. In: *Genetics, Genomics and Breeding of Peanuts. Genetics, Genomics and Breeding of Crop Plants*. CRC Press, pp. 1-12. ISBN 978-1-4822-3835-8 ; 978-1-4822-3837-2.
- Mallikarjuna, N., Senthilvel, S., & Hoisington, D. (2011).** Development of new sources of tetraploid *Arachis* to broaden the genetic base of cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Genet Resour Crop Evol*, 58, 889-907. <https://doi.org/10.1007/s10722-010-9627-8>.
- Masoomeh, J., Mehran, G., & Fatemeh, J. (2015).** Seed storage protein electrophoresis for identification of some groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Int Res J Appl Basic Sci*, 9, 1718-1721.

- Matsuoka, Y.**, Mitchell, S. E., Kresovich, S., Goodman, M., & Doebley, J. (2002). Microsatellites in Zea-variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3), 436-450. <https://doi.org/10.1007/s001220100694>.
- Mazliak, P.** (1999). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales, D. De vienne (Ed.), Inra (1998), p. 200.
- McKenzie, G. J.**, Fallon, P. G., Emson, C. L., Grecis, R. K., & McKenzie, A. N. (1999). Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *The Journal of experimental medicine*, 189(10), 1565-1572. <https://doi.org/10.1084/jem.189.10.1565>.
- Meirmans, P. G.** (2020). genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1126-1131. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.13145>.
- Mittag, D.**, Akkerdaas, J., Ballmer-Weber, B. K., Vogel, L., Wensing, M., Becker, W. M., ... & Vieths, S. (2004). Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6), 1410-1417. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.09.014>.
- Miyajima, I.**, Dombrowicz, D., Martin, T. R., Ravetch, J. V., Kinet, J. P., & Galli, S. J. (1997). Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE-or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *The Journal of clinical investigation*, 99(5), 901-914. <https://doi.org/10.1172/JCI119255>.
- Mofokeng, M. A.**, Amelework, B. A., Chipeta, O., Sibiya, J., Gerrano, A. S., Shargie, N., & Mashingaidze, K. (2021). Assessment of genetic variability in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes grown under South African conditions using agronomic and SSR markers. *Australian Journal of Crop Science*, 15(10). <https://doi.org/10.3316/informit.282581974538179>.
- Mohan, M.**, Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T. G., Yano, M., Bhatia, C. R., & Sasaki, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular breeding*, 3(2), 87-103. <https://doi.org/10.1023/A:1009651919792>.
- Molina, C.** (1995). L'allergie à l'aube du troisième millénaire. John Libbey Eurotext.
- Mondini, L.**, Noorani, A., & Pagnotta, M. A. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1(1), 19-35. <https://doi.org/10.3390/d1010019>.
- Mondoulet, L.** (2005). Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide : caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs (Doctoral dissertation, Toulouse, INSA).
- Mondoulet, L.**, Paty, E. B., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J.M., & Bernard, H. (2005). Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(11), 4547-4553. <https://doi.org/10.1021/jf050091p>.

- Moneret-Vautrin, D. A.** (1997). Les allergènes alimentaires, et leurs modifications par les technologies agro-alimentaires. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 37(1), 21-28. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(97\)80205-5](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(97)80205-5).
- Moneret-Vautrin, D. A., Hatahet, R., & Kanny, G.** (2001). Hydrolysats de protéines : laits hypoallergéniques et formules extensivement hydrolysées. Bases immuno-allergologiques de leur utilisation dans la prévention et le traitement de l'allergie au lait. *Archives de pédiatrie*, 8(12), 1348-1357. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(01\)00658-3](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(01)00658-3).
- Moneret-Vautrin, D. A., Sainte-Laudy, J., Kanny, G., & Frémont, S.** (1999). Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 82(1), 33-40. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62657-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62657-9).
- Moneret-Vautrin, D. A., Vitte, J., Jacquenet, S., Morisset, M., Denery-Papini, S., Renaudin, J. M., ... & Beaudouin, E.** (2011). Diagnostic de l'IgE-réactivité par analyse des composants moléculaires (test ISAC). *Revue Française d'Allergologie*, 51(2), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2011.01.007>.
- Morafo, V., Srivastava, K., Huang, C. K., Kleiner, G., Lee, S. Y., Sampson, H. A., & Li, X. M.** (2003). Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(5), 1122-1128. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.1463>.
- Moreno, S., Martín, J. P., & Ortiz, J. M.** (1998). Inter-simple sequence repeats PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica*, 101(1), 117-125. <https://doi.org/10.1023/A:1018379805873>.
- Moretzsohn, M. C., Barbosa, A. V., Alves-Freitas, D. M., Teixeira, C., Leal-Bertioli, S. C., Guimarães, P. M., Pereira, R.W., Lopes, C.R., Cavallari, M.M., Valls, J.F., Bertioli, D.J & Gimenes, M. A.** (2009). A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-40>.
- Moretzsohn, M. C., Leoi, L., Proite, K., Guimaraes, P. M., Leal-Bertioli, S. C. M., Gimenes, M. A., ... & Bertioli, D. J.** (2005). A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 111(6), 1060-1071. <https://doi.org/10.1007%2Fs00122-005-0028-x>.
- Moretzsohn, M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Kresovich, S., Valls, J. F. M., & Ferreira, M. E.** (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-11>.
- Morgante, M., & Olivieri, A. M.** (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal*, 3(1), 175-182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.t01-9-00999.x>.
- Mosmann, T. R., & Sad, S.** (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, 17(3), 138-146. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(96\)80606-2](https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)80606-2).
- Mothilal, A.** (2012). Groundnut. In *Technological Innovations in Major World Oil Crops*, Volume 1 (pp. 323-395). Springer, New York, NY.

Murray, J. S. (1998). How the MHC selects Th1/Th2 immunity. *Immunology today*, 19(4), 157-162. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01237-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01237-1).

Myriam, H. (2008). *Génétique moléculaire et évolutive*. Paris. Maloine.

.N.

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(2), 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.

Naito, Y., Suzuki, S., Iwata, Y., & Kuboyama, T. (2008). Genetic diversity and relationship analysis of peanut germplasm using SSR markers. *Breeding Science*, 58(3), 293-300.

Navarro, J., Schmitz, J. (1993). *Allergie alimentaire. Progrès en pédiatrie*. Doin, Paris, pp 272.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.371>.

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.

Neya, F. B., Koita, K., & Elise, S. (2017). Agro-morphological diversity of six peanut (*Arachis hypogaea* L.) breeding lines from three geographical areas. *Journal of Experimental Agriculture International*, 19(5), 1-12.

Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Sci J*, 9(1), 30-39.

Noti, M., Kim, B. S., Siracusa, M. C., Rak, G. D., Kubo, M., Moghaddam, A. E., ... & Artis, D. (2014). Exposure to food allergens through inflamed skin promotes intestinal food allergy through the thymic stromal lymphopoietin–basophil axis. *Journal of allergy and clinical immunology*, 133(5), 1390-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.01.021>.

.O.

Orgel, K., & Kulis, M. (2018). A mouse model of peanut allergy induced by sensitization through the gastrointestinal tract. In *Type 2 Immunity* (pp. 39-47). Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7896-0_4.

Oteng-Frimpong, R., Sriswathi, M., Ntare, B. R., & Dakor, F. D. (2015). Assessing the genetic diversity of 48 groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes in the Guinea savanna agro-ecology of

Ghana, using microsatellite-based markers. *African Journal of Biotechnology*, 14(32), 2485-2485. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14770>.

Ouazzani, N., Lumaret, R., & Villemur, P. (1995). Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L). *Agronomie*, 15(1), 31-37. <https://hal.inrae.fr/hal-02714997>

Oxford University Plants 400: *Arachis hypogaea*. (2021). Retrieved March 22, 2021, from <https://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/AB/Arachis>.

.P.

Pablos-Tanarro, A., López-Expósito, I., Lozano-Ojalvo, D., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2016). Antibody production, anaphylactic signs, and T-cell responses induced by oral sensitization with ovalbumin in BALB/c and C3H/HeOuJ mice. *Allergy, asthma & immunology research*, 8(3), 239-245. <https://doi.org/10.4168/aaair.2016.8.3.239>.

Paik-Ro, O. G., R. L. Smith, and D. A. Knauff. (1992). Restriction fragment length polymorphism evaluation of six peanut species within the *Arachis* section. *Theor. Appl. Genet.* 84, 201-208. <https://doi.org/10.1007%2FBF00224001>.

Palmer, G. W., Dibbern Jr, D. A., Burks, A. W., Bannon, G. A., Bock, S. A., Porterfield, H. S., McDermott, R.A & Dreskin, S. C. (2005). Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clinical Immunology*, 115(3), 302-312. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.02.011>.

Pandey, A. K., Sudini, H. K., Upadhyaya, H. D., Varshney, R. K., & Pandey, M. K. (2019). Hypoallergen peanut lines identified through large-scale phenotyping of global diversity panel: Providing hope toward addressing one of the major global food safety concerns. *Frontiers in genetics*, 10, 1177. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01177>.

Pandey, M. K., Gangurde, S. S., Sharma, V., Pattanashetti, S. K., Naidu, G. K., Faye, I., Hamidou, F., Desmae, H., Kane, N. A., Yuan, M., Vadez, V., Nigam, S. N., & Varshney, R. K. (2021). Improved genetic map identified major QTLs for drought tolerance- and iron deficiency tolerance-related traits in groundnut. *Genes (Basel)*. 12(1), 30-37 <https://doi.org/10.3390/genes12010037>.

Pascual, S., Martínez, J., & Pérez-Mateo, M. (2001). La barrera intestinal : trastornos funcionales en enfermedades digestivas y extradigestivas. *Gastroenterología y Hepatología*, 24(5), 256-267. [https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(01\)70167-7](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(01)70167-7).

Paterson, A. H. (1996). Making genetic maps. In: Paterson A. H., editor. *Genome Mapping in Plants*. Austin, Tex, USA: R. G. Landes Company, San Diego, Calif, USA, Academic Press. pp. 23–39.

Patey-Mariaud de Serre, N., Verkarre, V., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., & Schmitz, J. (2000). Diagnostic étiologique d'une atrophie villositaire. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 24(4), 436-446.

Patey-Mariaud de Serre, N., Verkarre, V., Roche, B., Brousse, N. (1998). Diagnostic histologique. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue*, n°6.

- Peakall**, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Peeters**, K. A., Koppelman, S. J., Van Hoffen, E., Van Der Tas, C. W., den Hartog Jager, C. F., Penninks, A. H., Hefle, S. L., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Knol, E.F & Knulst, A. C. (2007). Does skin prick test reactivity to purified allergens correlate with clinical severity of peanut allergy?. *Clinical & Experimental Allergy*, 37(1), 108-115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02628.x>.
- Pelz**, B. J., & Bryce, P. J. (2015). Pathophysiology of Food Allergy Food allergy Pathophysiology Oral tolerance Sensitization IgE. *Pediatric Clinics of NA*, 62(6), 1363–1375. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.07.004>.
- Phipatanakul**, W., & Wood, R. A. (1999). Resolution of Peanut Allergy: Case-Control Study. *Pediatrics*, 104(Supplement 2), 364-364. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7140.1271>.
- Pichler**, W. J. (2004). Immune mechanism of drug hypersensitivity. *Immunology and Allergy Clinics*, 24(3), 373-397. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2004.03.012>.
- Poms**, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food additives and contaminants*, 21(1), 1-31. <https://doi.org/10.1080/02652030310001620423>.
- Pons**, L., Chery, C., Romano, A., Namour, F., Artesani, M. C., & Guéant, J. L. (2002). The 18 kDa peanut oleosin is a candidate allergen for IgE-mediated reactions to peanuts. *Allergy*, 57, 88-93. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.57.s72.16>.
- Ponvert**, C. (1999). Rôle des cytokines dans la réaction allergique inflammatoire. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 39(1), 45-61. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(99)80040-9).
- Prakash**, V., & Narasinga Rao, M. S. (1986). Physicochemical properties of oilseed protein. *Critical Reviews in Biochemistry*, 20(3), 265-363.
- Pritchard**, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>.
- Proite**, K., Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., Moretzsohn, M. C., da Silva, F. R., Martins, N. F., & Guimarães, P. M. (2007). ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC plant biology*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-7>.

.Q.

- Queller**, D. C., Strassmann, J. E., & Hughes, C. R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends in ecology & evolution*, 8(8), 285-288. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90256-O](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90256-O).

.R.

- Rabjohn**, P., Helm, E. M., Stanley, J. S., West, C. M., Sampson, H. A., Burks, A. W., & Bannon, G. A. (1999). Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3. *The Journal of clinical investigation*, 103(4), 535-542. <https://doi.org/10.1172/JCI5349>.
- Rafalski**, J. A., Vogel, J. M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C., & Tingey, S. V. (1996). Generating and using DNA markers in plants. In *Nonmammalian genomic analysis* (pp. 75-134). Academic Press.
- Raina**, S. N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K. P., & Devarumath, R. M. (2001). RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44(5), 763-772. <https://doi.org/10.1139/g01-064>.
- Ramasamy**, R. K., Ramasamy, S., Bindroo, B. B., & Naik, V. G. (2014). STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, 3(1), 1-3. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-431>.
- Rancé**, F., & Dutau, G. (1998). Aspects pratiques de l'allergie à l'arachide : du diagnostic à la prévention. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 38(10), 896-899. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(98\)80159-7](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(98)80159-7).
- Ranee**, F., & Dutau, G. (1997). Labial food challenge in children with food allergy. *Pediatric allergy and immunology*, 8(1), 41-44. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.1997.tb00141.x>.
- Rao**, P. S., Bharathi, M., & Reddy, K. B. (2013). Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties through chemical tests and electrophoresis of soluble seed proteins. *Legume Research-An International Journal*, 36(6), 475-483.
- Rao**, V. R., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 1-19. <https://doi.org/10.1023/A:1013359015812>.
- Rao**, V. R., & Murty, U. R. (1994). Botany—morphology and anatomy. In *The groundnut crop* (pp. 43-95). Springer, Dordrecht.
- Ren**, X., Jiang, H., Yan, Z., Chen, Y., Zhou, X., Huang, L., ... & Liao, B. (2014). Genetic diversity and population structure of the major peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars grown in China by SSR markers. *PLoS One*, 9(2), e88091. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088091>.
- Resende**, M. D. V. (2007). Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético, Embrapa Florestas, Colombo. Forestry Embrapa, Colombo, PR, Brazil.
- Ridout**, C. J., Donini, P. (1999). Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science*, 4(2), 76-79. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01363-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01363-6).
- Robledo**, G., And G. Seijo. (2010). Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a

new proposal for genome arrangement. TAG Theoretical and Applied Genetics. Available at: <http://www.springerlink.com/content/h883047j888m9h86/>.

Robledo, G., Lavia, G. I., & Seijo, G. (2009). Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(7), 1295–1307. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-0981-x>.

Roldán-ruiz, I., Riek, J. De, Muylle, H., Baert, J., Ghesquiere, A., & Vandewalle, M. (2005). Actes des Journées AFPF – 15-16 Mars 2005 – Génétique et prairies 145. 145–159.

Rupa, P., & Mine, Y. (2012). Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Allergy*, 67(1), 74-82. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02724.x>.

.S.

Saldanha, J. C. S., Gargiulo, D. L., Silva, S. S., Carmo-Pinto, F. H., Andrade, M. C., Alvarez-Leite, J. I., ... & Cara, D. C. (2004). A model of chronic IgE-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(6), 809-816. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000600005>.

Sampson, H. A. (2001). Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(5), 891-896. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.114708>.

Sampson, H. A. (2002). Peanut allergy. *New England Journal of Medicine*, 346(17), 1294-1299. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp012667>.

Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 113(5), 805-819. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.014>.

Sampson, H. A., & Ho, D. G. (1997). Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *Journal of allergy and clinical immunology*, 100(4), 444-451. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70133-7](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70133-7).

Sanford, J. G. (1983). Ploidy manipulations. In " *Methods in fruit breeding*" edited by Moore, JN and J. Janick.

Satitsuksanoa, P., Jansen, K., Głobińska, A., van de Veen, W., & Akdis, M. (2018). Regulatory immune mechanisms in tolerance to food allergy. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02939>.

Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. (2000). Arlequin: a software for population genetics data analysis. *User manual ver, 2*, 2496-2497.

Schneider, S., Roessli, D., & Excoffier, L. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>.

- Schülke**, S., & Albrecht, M. (2019). Mouse models for food allergies: Where do we stand?. *Cells*, 8(6), 546. <https://doi.org/10.3390/cells8060546>.
- Sedlik**, C. (1996). Th1 and Th2 subsets of T lymphocytes: characteristics, physiological role and regulation. *Bulletin de L Institut Pasteur*, 94(3), 173-200. [https://doi.org/10.1016/S0020-2452\(97\)86016-2](https://doi.org/10.1016/S0020-2452(97)86016-2).
- Seijo**, G., Lavia, G. I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D. A., Bertioli, D. J., & Moscone, E. A. (2007). Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *American Journal of Botany*, 94(12), 1963-1971. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1963>.
- Semagn**, K., Bjørnstad, Å., & Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5(25).
- Sicherer**, S. H. (2002). Food allergy. *The Lancet*, 360(9334), 701-710. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09831-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09831-8).
- Sicherer**, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S116-S125. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.028>.
- Sicherer**, S. H., Muñoz-Furlong, A., & Sampson, H. A. (2003). Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *Journal of allergy and clinical immunology*, 112(6), 1203-1207. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(03\)02026-8](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(03)02026-8).
- Singh**, A. K., Sivaramakrishnan, S., Mengesha, M. H., & Ramaiah, C. D. (1991). Phylogenetic relations in section *Arachis* based on seed protein profile. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(5), 593-597. <https://doi.org/10.1007/BF00226795>.
- Singh**, A., Raina, S. N., Rajpal, V. R., & Singh, A. K. (2018). Seed protein fraction electrophoresis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions and wild species. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(3), 465-481. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0521-8>.
- Singh**, A., Raina, S. N., Sharma, M., Chaudhary, M., Sharma, S., & Rajpal, V. R. (2021). Functional uses of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed storage proteins. *Grain and Seed Proteins Functionality*.
- Singh**, A.K., J. Smartt, C.E. Simpson, and S.N. Raina. (1998). Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 45, 119-126. <https://doi.org/10.1023/A:1008646422730>.
- Singh**, K. P., Singh, A., Raina, S. N., Singh, A. K., & Ogihara, Y. (2002). Ribosomal DNA repeat unit polymorphism and heritability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) accessions and related wild species. *Euphytica*, 123(2), 211-220. <https://doi.org/10.1023/A:1014966101927>.
- Smartt**, J. O. S. E. P. H., & Stalker, H. T. (1982). Speciation and cytogenetics in *Arachis*.
- Sokol**, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G., & Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature immunology*, 9(3), 310-318. <https://doi.org/10.1038/ni1558>.

- Song, G. Q., Li, M. J., Xiao, H., Wang, X. J., Tang, R. H., Xia, H., Zhao, C.Z & Bi, Y. P. (2010).** EST sequencing and SSR marker development from cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(3), 7-8. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue3-fulltext-10>.
- Spooner, D., Van Treuren, R., de Vicente, M.C. (2005).** Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Stalker, H. T., Dhesi, J. S., & Parry, D. C. (1991).** An analysis of the B genome species *Arachis batizocoi* (Fabaceae). *Plant systematics and evolution*, 174(3), 159-169. <https://doi.org/10.1007/BF00940337>.
- Stalker, H.T., Simpson, C.E. (1995).** Germplasm resources in *Arachis*. In: Pattee, H.E., Stalker, H.T. (Eds.), *Advances in Peanut Science*. American Peanut Research and Education Society, Stillwater, pp. 14–53.
- Stanley, J. S., King, N., Burks, A. W., Huang, S. K., Sampson, H., Cockrell, G., Helm, R. M., West, C. M & Bannon, G. A. (1997).** Identification and mutational analysis of the immunodominant IgE binding epitopes of the major peanut Allergen Ara h 2. *Archives of biochemistry and biophysics*, 342(2), 244-253. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.9998>.
- Stavnezer, J. (1996).** Immunoglobulin class switching. *Current opinion in immunology*, 8(2), 199-205. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80058-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80058-6).
- Subramanian, V., Gurtu, S., Rao, R. N., & Nigam, S. N. (2000).** Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *Genome*, 43(4), 656-660. <https://doi.org/10.1139/g00-034>.
- Suchoszek-Lukaniuk, K., Jaromin, A., Korycińska, M., & Kozubek, A. (2011).** Health Benefits of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seeds and Peanut Oil Consumption. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, 873–880. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10103-3>.
- Sun, P., Li, D., Li, Z., Dong, B., & Wang, F. (2008).** Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. *The Journal of nutritional biochemistry*, 19(9), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.08.007>.
- Sutton, B. J., & Davies, A. M. (2015).** Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunological Reviews*, 268(1), 222–235. <https://doi.org/10.1111/imr.12340>.
- Swamy, B. M., Upadhyaya, H. D., Goudar, P. K., Kullaiswamy, B. Y., & Singh, S. (2003).** Phenotypic variation for agronomic characteristics in a groundnut core collection for Asia. *Field Crops Research*, 84(3), 359-371. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00102-3).

.T.

- Taberlet, P., Zimmermann, N. E., Englisch, T., Tribsch, A., Holderegger, R., Alvarez, N., ... & IntraBioDiv Consortium. (2012).** Genetic diversity in widespread species is not congruent with species richness in alpine plant communities. *Ecology Letters*, 15(12), 1439-1448. Tagu, D., &

Moussard, C. (2006). Principes des techniques de biologie moléculaire: 2e édition, revue et augmentée. Editions Quae.

Tagu, D., & Moussard, C. (2006). Principes des techniques de biologie moléculaire : 2e édition, revue et augmentée. Editions Quae.

Tang Wang, C., Dao Yang, X., Xu Chen, D., Lin Yu, S., Zhen Liu, G., Yi Tang, Y., & Zhi Xu, J. (2007). Isolation of simple sequence repeats from groundnut. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), 473-480. <https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-10>.

Tang, R., Gao, G., He, L., Han, Z., Shan, S., Zhong, R., ... & Zhuang, W. (2007). Genetic diversity in cultivated groundnut based on SSR markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(5), 449-459.

Tanksley, S. D., & Orton, T. J. (2012). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier.

Tombs, M. P. (1965). An electrophoretic investigation of groundnut proteins: the structure of Arachins A and B. *Biochemical Journal*, 96(1), 119. <https://doi.org/10.1042/bj0960119>.

Trujillo, I., Rallo, L., & Arus, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2), 318–324. <https://doi.org/10.21273/jashs.120.2.318>.

Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., ... & Karasuyama, H. (2008). Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, 28(4), 581-589. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.008>.

.U.

Upadhyaya, H. D. (2003). Phenotypic diversity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) core collection assessed by morphological and agronomical evaluations. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(5), 539-550. <https://doi.org/10.1023/A:1023980713848>.

Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Vadez, V., Hamidou, F., Singh, S., Varshney, R. K., & Liao, B. (2014). Multiple resistant and nutritionally dense germplasm identified from mini core collection in peanut. *Crop Science*, 54(2), 679-693. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.07.0493>.

.V.

Valls, J.F.M., and C.E. Simpson. 2005. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. *Bonplandia* 14: 35–63.

Van de Peer, Y., & De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Bioinformatics*, 10(5), 569-570. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/10.5.569>.

Van Der Vossen, H. A. 2007. Oleagineux (ressources végétales de l'Afrique tropicale 14) PROTA 14 (Fondation PROTA & G. S. Mkamilo, eds.). Retrieved from https://books.google.dz/books/about/Ressources_végétales_de_l_Afrique_trop.html?id=Wj6rtAEACAAJ&redir_esc=y.

- Variath**, M. T., & Janila, P. (2017). of Peanut. *Peanut*, 7–27. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-63935-2>.
- Varshney**, R. K., Bertoli, D. J., Moretzsohn, M. D. C., Vadez, V., Krishnamurthy, L., Aruna, R., Nigam, S.N., Moss, B.J., Seetha, K., Ravi, K., He, G., Knapp, S.J & Hoisington, D. A. (2009a). The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(4), 729-739. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0933-x>.
- Varshney**, R. K., Mahendar, T., Aruna, R., Nigam, S. N., Neelima, K., Vadez, V., & Hoisington, D. A. (2009b). High level of natural variation in a groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm collection assayed by selected informative SSR markers. *Plant Breeding*, 128(5), 486-494. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01638.x>.
- Varshney**, R. K., Pandey, M. K., & Puppala, N. (2017). The Peanut Genome: An Introduction. In the Peanut Genome (pp. 1-6). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63935-2_1.
- Viviana Becerra**, V., Mario Paredes, C., Carmen Rojo, M., Díaz, L. M., & Blair, M. W. (2010). Microsatellite marker characterization of Chilean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm. *Crop Science*, 50(5), 1932-1941. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.08.0442>.
- Von Pirquet**, C. (1906). Allergie. *Munchen Med Wchnschr*, 53, 1457-1458.
- Voylovokov**, A. V., & Priyatkina, S. N. (2004). Linkage of genes controlling morphological traits with isozyme markers of rye chromosomes. *Russian Journal of Genetics*, 40(1), 56–61. <https://doi.org/10.1023/B:RUGE.0000013449.56274.a9>.
- .W.**
- Wang**, C. T., Song, G. S., Wang, Z. W., Li, H. J., Han, H. W., Chi, X. Y., ... & Sun, X. S. (2022). Assessment of genetic diversity among Chinese high-oleic peanut genotypes using miniature inverted-repeat transposable element markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01341-y>.
- Wang**, H., Khera, P., Huang, B., Yuan, M., Katam, R., Zhuang, W., Harris-Shultz, K. M., Moore, K. K., Culbreath, A., Zhang, X. K., Varshney, R., Xie, L., Guo, B. (2016). Analysis of genetic diversity and population structure of peanut cultivars and breeding lines from China, India and the US using simple sequence repeat markers. *Journal of integrative plant biology*, 58(5), 452-465. <https://doi.org/10.1111/jipb.12380>.
- Wang**, M. L., Sukumaran, S., Barkley, N. A., Chen, Z., Chen, C. Y., Guo, B., Pittman, R. N., Stalker, H. T., Holbrook, C.C., Pederson, G.A., Yu, J. (2011). Population structure and marker–trait association analysis of the US peanut (*Arachis hypogaea* L.) mini-core collection. *Theoretical and applied genetics*, 123(8), 1307-1317. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1668-7>.
- Wani**, S. H., & Kumar, V. (Eds.). (2020). Heat Stress Tolerance in Plants: Physiological, Molecular and Genetic Perspectives. John Wiley & Sons.
- Waserman**, S., & Watson, W. (2011). Food allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-7-s1-s7>.

- Weber, D., & Helentjaris, T.** (1989). Mapping RFLP loci in maize using BA translocations. *Genetics*, 121(3), 583-590. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.3.583>.
- Weiner, H. L.** (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunology today*, 18(7), 335-343. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01053-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01053-0).
- Weiner, H. L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S. J., Al-Sabbagh, A., Santos, L., ... & Hafler, D. A.** (1994). Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annual review of immunology*, 12(1), 809-837. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.004113>.
- Welsh, J., & McClelland, M.** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218. <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>.
- Wide, L., Bennich, H., & Johansson, S. G. O.** (1967). Diagnosis of allergy by an *in-vitro* test for allergen antibodies. *The Lancet*, 290(7526), 1105-1107.
- Winter, P., & Kahl, G.** (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 438-448. <https://doi.org/10.1007/bf00364619>.
- Wood, R. A.** (2003). The natural history of food allergy. *Pediatrics*, 111(Supplement 3), 1631-1637.
- Wright, G.** (2004). Peanuts. In *Encyclopedia of Grain Science* (Vol. 107, pp. 438–444). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-765490-9/00125-7>.
- Wright, S.** (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395-420.

.X.

- Xiong, F., Liu, J., Jiang, J., Zhong, R., He, L., Han, Z., ... & Tang, R.** (2013). Molecular profiling of genetic variability in domesticated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) based on ISJ, URP, and DAMD markers. *Biochemical genetics*, 51(11), 889-900. <https://doi.org/10.1007/s10528-013-9615-8>.
- Xu, Y.** (2010). *Molecular plant breeding*. CAB International, CIMMYT Mexico, pp.734
- Xue, W., Cong, Y., Shi, A., Deng, L., Sheng, X., & Liu, Y.** (2016). Peanut Allergy. *Peanuts: Processing Technology and Product Development*, 327–341. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809595-9.00006-5>.

.Y.

- Yadawa, U. L.** (1986). A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *HortScience*, 21(6), 1449-1450.
- Yamada, T., Aibara, S., & Morita, Y.** (1979). Isolation and some properties of arachin subunits. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43(12), 2563-2568.

Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B., Ye, Z. H., & Mao, J. X. (1999). POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Yol, E., Furat, S., Upadhyaya, H. D., & Uzun, B. (2018). Characterization of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) collection using quantitative and qualitative traits in the Mediterranean Basin. *Journal of integrative agriculture*, 17(1), 63-75. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61675-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61675-7).

Young, N.D., N.F. Weeden & G. Kochert. (1996). Genome mapping in legumes (Fam. Fabaceae). In: A.H. Paterson (Ed.), Genome Mapping in Plants, pp. 211-227. R.G. Landes Co., Austin, Texas.

.Z.

Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>.

Zhao C.X., Jia L.H., Wang Y.F., Wang M.L., McGiffen Jr M.E. (2015). Effects of different soil texture on peanut growth and development. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(18):2249-2257. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1059845>.

Zhao G.S., Li W.J., Sun Q. (2007). Effects of different soil texture on dry matter accumulation of *Alfalfa*. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 44(5):642-646.

Zhou, C., Ludmila, T., Sun, N., Wang, C., Pu, Q., Huang, K., & Che, H. (2016). BALB/c mice can be used to evaluate allergenicity of different food protein extracts. *Food and Agricultural Immunology*, 27(5), 589-603. <https://doi.org/10.1080/09540105.2015.1129600>.

Annexes

ANNEXE 1

Extraction des protéines

Solution d'extraction des protéines

- 2,125 ml de solution stocke
- 2,5% de 2 β -mercaptoéthanol
- Qsp 5 ml H₂O distillée

Solution stocke

- 20 ml de glycérol
- 12,5 ml de Tris-HCl 1M, pH 6,8
- 4g de SDS
- 10 mg de Bleu de bromophénol
- 24,1 ml H₂O distillée

Tampon Tris-HCl 1M, pH 6,8

- 12,11g de Trizma base
- Ajouter 90 ml de l'H₂O distillée
- Ajuster le pH à 6,8 avec du HCl fumant
- Compléter le volume à 100 ml avec l'H₂O distillée

ANNEXE 2

Electrophorèse des protéines

Acrylamide mixe 30%

- 29,2 g d'acrylamide
- 0,8 g de bis-acrylamide
- 100 ml d'H₂O distillée

Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

- 18,17 g de Trizma base
- Ajouter 90 ml de l'H₂O distillée
- Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl fumant
- Compléter le volume à 100 ml avec l'H₂O distillée

Solution de SDS 10%

- 10 g de SDS
- 100 ml d'H₂O distillée

Solution d'APS 10%

- 1 g d'APS
- 10 ml d'H₂O distillée

Gel de séparation (12%)

- 1,7 ml d'H₂O distillée
- 2 ml Acrylamide mixe 30%
- 1,3 ml du tampon Tris 1,5 M, pH 8,8
- 50 µl de SDS 10%
- 50 µl d'APS 10%
- 2 µl du TEMED
- Volume total 5 ml

Gel de concentration (5%)

- 2,1 ml d'H₂O distillée
- 0,5 ml Acrylamide mixe 30%
- 0,38 ml du tampon Tris 1 M, pH 6,8
- 30 µl de SDS 10%
- 30 µl d'APS 10%
- 3 µl du TEMED
- Volume total 3 ml

Tampon de migration

- 3g de Trizma base
- 14,4 g de glycine
- 1g d'SDS
- Ajuster le pH à 8,3

- Compléter le volume à 1000 ml

Solution de coloration

- 1 g de Bleu de Coomassie Brillant R-250
- 450 ml de méthanol
- 100 ml d'acide acétique glacial
- 450 ml d'H₂O distillée

Solution de décoloration

- 100 ml de méthanol
- 100 ml d'acide acétique glacial
- 800 ml d'H₂O distillée

25 µl de chaque extrait protéique ont été déposés dans chaque puit, la migration a été arrêtée à l'arrivée du front de migration à la sortie du gel

ANNEXE 3 Extraction d'ADN

Tampon CTAB 2X, pH 8

- 20 g de CTAB
- 12,11 g de Trizma base
- 7,44 g de Na₂ EDTA
- 81,8 g d'NaCl
- 10 g de PVP 40
- Qsp 1000 ml H₂O ultra pure
- Commencer par dissoudre le CTAB à la chaleur (50°C) dans 800 ml d'eau up, puis ajouter dans l'ordre les autres produits
- Ajuster le pH à 8 avec l'HCl, puis compléter le volume à 1 litre
- Stériliser le tampon à l'autoclave
- Ajouter 1 ml de 2 β-mercaptoethanol (ou bisulfite de sodium) juste avant l'utilisation de la solution.

Mélange Phénol-Chloroforme-alcool isoamylique (25 : 24 : 1)

Pour préparer un volume de 20 ml mélanger 10 ml de phénol avec 9,6 ml du chloroforme et 0,4 ml d'alcool isoamylique

Mélange Chloroforme-alcool isoamylique (24 : 1)

Pour préparer un volume de 50 ml mélanger 48 ml de chloroforme avec 2 ml d'alcool isoamylique

Solution de lavage 1

- 1,6 g d'acétate de sodium
- 24 ml d'H₂O up
- Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter 76 ml d'éthanol à 100 %

Solution de lavage 2

- 0,077 g d'acétate d'ammonium
- 24 ml d'H₂O up
- Dissoudre l'acétate d'ammonium avant d'ajouter 76 ml d'éthanol à 100%

Tampon TE 0,1X, pH 8

- 0,012 g de Trizma base
- 0,004 g de Na₂ EDTA
- Qsp 10 ml d'H₂O up
- Stériliser le tampon à l'autoclave

Protocole d'extraction d'ADN selon la méthode de Doyle et Doyle 1990

- Préchauffer le tampon CTAB 2X additionné de β -mercaptoéthanol dans un bain marie à 65 °C
- Mettre une jeune feuille de la plante d'arachide dans un eppendorf
- Ajouter 900 μ l du tampon CTAB 2X additionné de β -mercaptoéthanol préchauffé à 65 °C
- Ecraser la feuille dans le tampon avec un embout soudé et incuber pendant 60 min dans un bain marie à 65 °C avec agitation
- Centrifuger pendant 10 min à 10 000 g et 4 °C
- Récupérer le surnageant (\approx 800 μ l) dans un nouveau tube eppendorf de 2 ml
- Ajouter 800 μ l (1 vol) Phénol/chloroforme/Alcool isoamylique (25 :24 :1)
- Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm)
- Centrifuger pendant 10 min à 10000 g à 4°C
- Récupérer la phase aqueuse supérieur à l'aide de micropipette dans un nouveau tube eppendorf (Éviter de prendre la couche blanche au milieu)
- Ajouter 800 μ l (1vol) chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1) puis giter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm)
- Centrifuger pendant 10 min à 10000 g et 4°C. Récupérer la phase aqueuse supérieur à l'aide d'une micropipette dans un nouveau tube d'eppendorf
- Pour un meilleur résultat, répéter cette dernière étape deux fois
- Ajouter 3 à 5 μ l d'RNase, agiter par inversion et incuber pendant 30 min à 37 °C
- Ajouter \approx 540 μ l (2/3 Vol) d'Isopropanol froid (-20°C)
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche
- Laisser précipiter à -20 °C pendant 45 à 60 min
- Centrifuger pendant 10 min à 10 000 g et 4 °C
- Eliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette)
- Ajouter 500 μ l de la solution de lavage 1
- Incuber pendant 15 min à température ambiante
- Centrifuger pendant 5 min à 10 000 g et 4 °C
- Eliminer le surnageant et ajouter 500 μ l de la solution de lavage 2
- Ne pas incuber plus de 5 min
- Centrifuger pendant 5 min à 10 000 g et 4 °C
- Eliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min
- Suspendre le culot d'ADN dans 100 μ l de TE 0,1X
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4 °C avant dosage

ANNEXE 4 Contrôle de la qualité d'ADN

Tampon TBE 1X

- 10,8 g de Trizma base
- 5,5 g d'acide borique
- 0,744 g d' Na₂ EDTA
- Qsp 1000 ml d'H₂O up
- Stériliser le tampon à l'autoclave

Préparation du gel d'agarose 0,8 %

- 0,8 g d'agarose
 - 100 ml du tampon TBE 1X
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes (2 à 4 minutes à puissance maximale). Laisser le gel refroidir un peu avant d'ajouter 7 µl du gel stain
- Déposer 5 µL (soit 500 ng) de chaque échantillon
- Faire migrer l'ADN pendant 40 min à 100V

Dosage par Nanodrop

Mesurer sur un Nanodrop la $DO_{260/280}$ et la $DO_{260/230}$, les résultats obtenus peuvent être interprétés comme suivant :

- $1,8 < DO_{260/280} < 2$ l'ADN est pure
- $DO_{260/280} < 1,7$ l'ADN est contaminé par les protéines
- $DO_{260/280} > 2$ l'ADN est contaminé par l'ARN

- $1,8 < DO_{260/230} < 2,2$ l'ADN est pure
- $DO_{260/230} > 2,2$ la molécule d'ADN est contaminé par des solvants, des sels, ou autres contaminants organiques
- $DO_{260/230} < 1,6$ l'ADN est contaminé par des carbohydrates ou des résidus de phénols

ANNEXE 5

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

Solution d'acrylamide-Bis acrylamide 40%

- 38 g d'acrylamide
- 2 g de Bis-acrylamide
- Qsp 100 ml d'H₂O up

Gel d'acrylamide 6%

- 15 ml de solution d'acrylamide-Bis acrylamide 40%
- 10 ml de solution de TBEX10
- Qsp 100 ml avec de l'eau ultra pure

Utiliser 40 ml de la solution du gel 6% à laquelle 125µl de l'APS et 40 µl du TEMED doivent être rajouter juste avant de couler le gel entre les deux plaques de verre

Traitement des plaques pour gel de polyacrylamide

Après nettoyage des plaques, placer les sous une hotte chimique afin de procéder à un traitement qui permet au gel de rester collé sur la surface de la plaque pleine en utilisant 2 solutions

1- Plaque encoche

- Préparation de solution de traitement (Repel-Silane)
 - 2 ml de la solution de Diméthylchlorosilane
 - 98 ml de chlorofome
- Traitement de la plaque
 - Nettoyer la surface de la plaque avec de l'éthanol absolu
 - Répartir 400µl de la solution Repel-Saline sur toute la surface de la plaque puis essuyer à l'aide du papier Josef afin de répartir uniformément la solution
 - Laisser sécher pendant 30 minutes
 - Répartir une deuxième fois 400µl de la solution Repel-Saline sur toute la surface de la plaque puis essuyer à l'aide du papier Josef afin de répartir uniformément la solution
 - Laisser sécher

2- Plaque pleine

- Préparation de solution de traitement (Bind-Silane)
 - 240 µl de la solution de PropylMetacrylate
 - 80 ml de l'éthanol absolu
 - 20 ml de l'acide acétique à 10 %
- Traitement de la plaque
 - Nettoyer la surface de la plaque avec de l'éthanol absolu
 - Répartir 400µl de la solution Bind-Saline sur toute la surface de la plaque puis essuyer à l'aide du papier Josef afin de répartir uniformément la solution
 - Laisser sécher pendant 10 min
 - Vaporiser la plaque avec de l'éthanol absolu puis essuyer à l'aide du papier Josef

- Laisser sécher à l'aire libre

Préparation des solutions de coloration des gels

1- Solution Fix stop

- 200 ml de l'éthanol absolu
- 10 ml d'acide acétique
- Qsp 2 litres avec de l'eau ultra pure

2- Solution de coloration

- 2,5 g de nitrate d'argent
- Qsp 2 litres avec de l'eau ultra pure
- 3 ml de formaldéhyde juste avant l'utilisation

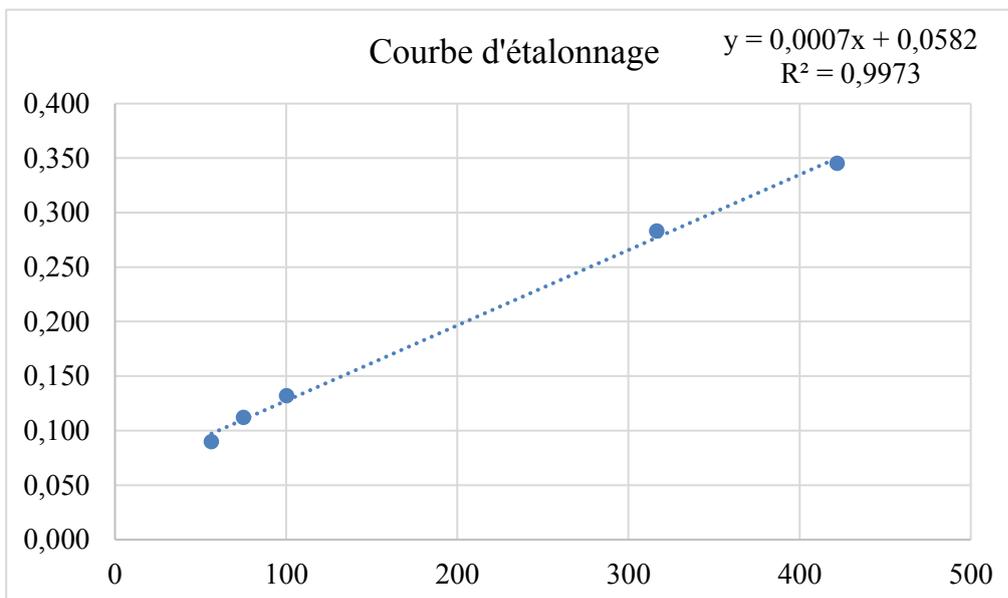
3- Solution de développement

- 30 g de NaOH
- Qsp 2 litre avec de l'eau ultra pure
- 4 ml de formaldéhyde juste avant l'utilisation

Coloration des gels

- Incuber le gel dans la solution Fix stop pendant 6 à 8 minutes
- Incuber le gel dans le bac de la solution de coloration pendant 6 à 7 minutes
- Incuber le gel dans un bac de l'eau ultra pure pendant 30 secondes
- Incuber le gel dans le bac de la solution de développement jusqu'au développement de la coloration des bandes des amplicons et du marqueur de taille
- Enfin, incuber le gel encore une fois dans le bac de la solution du Fix stop pendant une à deux minutes afin d'éviter le rétrécissement du gel.

ANNEXE 6
Dosage des protéines par la méthode de Bradford



Courbe d'étalonnage du BSA

ANNEXE 7

Dosage des anticorps par la méthode ELISA de type indirect

Préparation du PBS 0,1M pH 7,4

Concentration et réactifs	Quantité
137 mM NaCl	8,0 g
2,7 mM KCl	0,2 g
10 mM Na ₂ HPO ₄	1,42 g
1,76 mM KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O up	Qsp 1 litre
Ajustement du pH à 7,4	

Préparation du tampon citrate-phosphate 50 mM**1- Solution dibasique sodium phosphate (Na₂HPO₄) 0,2M (Solution 1)**

- 2,48 g de Na₂HPO₄
- Qsp 100 ml H₂O up

2- Solution d'acide citrique 0,1M (Solution 2)

- 2,1 g d'acide citrique
- Qsp 100 ml H₂O up

Mélanger 25,7 ml de la solution 1 avec 24,3 ml de la solution 2, compléter le volume à 100 ml avec de l'eau ultra pure

Enfin, ajuster le pH à 5

Préparation de la solution de révélation (OPD)

Dissoudre 10 mg (un comprimé) de l'OPD p8287 dans 10ml du tampon citrate, ajouter 4µl d'H₂O₂ juste avant de déposer.

ANNEXE 8

Matrice de similarité

Variables	Gr.hab	Bra.pet	Num.bra	Hght.stm	Pl.wdth	St.pig	St.src	Inf.typ	Std.pet.col	Peg.pig	Flo.dis	Lef.col	Lft.lgth	Lft.wdth	Lft.shp	Lft.src	Lft.mgn	Lft.tip	Dys.50%fwg	Dys.mty	Chlo.ctn	Bch.dty	Nod.cap	Lef.are	Pod.csn	Num.sd.pod	Txt.pod.src	Pod.bk	Pod.ret	Teg.asp	Teg.col	Pri.sd.col	Oil.ctn	Pod.wdth	Wght.10.pod	Sd.wdth	Sd.lgth	Sd.shp
Gr.hab	1	0.144	0.029	0.377	0.488	-0.276	0.210	0.231	-0.092	-0.009	-0.171	-0.127	0.419	0.501	0.013	0.007	-0.197	-0.009	0.321	-0.067	0.054	0.310	0.034	0.472	0.054	0.510	0.040	0.468	0.090	0.269	0.192	-0.302	-0.209	0.364	-0.029	-0.341	0.177	0.309
Bra.pet	0.144	1	-0.211	-0.118	0.124	0.027	-0.014	0.198	0.104	0.050	0.130	0.334	0.235	0.304	0.018	0.149	0.134	-0.006	-0.138	0.014	-0.431	-0.192	-0.219	0.299	-0.150	-0.238	-0.300	-0.353	-0.408	-0.116	0.091	-0.271	-0.109	-0.449	-0.554	-0.483	-0.594	-0.372
Num.bra	0.029	-0.211	1	0.088	0.167	0.346	0.121	0.498	0.116	-0.107	-0.115	-0.231	-0.040	-0.189	-0.113	-0.042	0.056	0.033	-0.196	-0.238	0.284	0.208	0.138	-0.267	0.235	0.207	-0.011	0.174	0.039	-0.107	-0.255	-0.059	0.397	-0.029	0.244	0.062	0.137	-0.126
Hght.stm	0.377	-0.118	0.088	1	0.252	-0.396	0.194	-0.188	-0.182	0.094	0.094	0.013	0.118	0.305	-0.156	0.066	-0.196	0.040	0.256	0.289	0.102	0.334	-0.046	-0.013	-0.058	0.251	0.103	0.183	-0.116	0.091	0.327	0.301	-0.313	0.302	0.041	-0.256	0.275	0.319
Pl.wdth	0.488	0.124	0.167	0.252	1	-0.156	0.181	0.009	-0.085	-0.027	-0.281	-0.101	0.456	0.277	-0.168	0.198	-0.065	0.147	0.193	-0.038	0.163	0.358	0.214	0.051	-0.001	0.436	0.021	0.399	0.023	0.147	0.324	-0.016	-0.160	0.342	0.151	-0.102	0.267	0.228
St.pig	-0.276	0.027	0.346	-0.396	-0.156	1	0.113	0.364	0.140	-0.336	0.000	-0.077	-0.031	-0.170	0.120	0.101	0.000	-0.202	-0.364	0.088	-0.426	-0.167	0.167	0.042	0.000	-0.152	-0.083	-0.384	0.140	-0.336	-0.325	-0.122	0.429	-0.205	0.103	0.219	-0.204	-0.107
St.src	0.210	-0.014	0.121	0.194	0.181	0.113	1	0.025	0.053	-0.084	-0.066	-0.023	0.392	0.356	0.112	0.417	0.415	0.258	0.037	0.007	-0.044	0.324	0.099	0.000	-0.399	-0.169	-0.026	-0.142	0.087	0.087	0.324	0.192	-0.268	0.093	-0.041	-0.142	-0.101	-0.048
Inf.typ	0.231	0.198	0.498	-0.188	0.009	0.364	0.025	1	0.122	-0.161	-0.148	0.008	-0.008	-0.046	0.047	-0.044	0.059	-0.308	0.111	-0.250	0.035	0.036	-0.036	0.114	0.193	0.033	-0.253	0.097	-0.010	-0.161	-0.027	-0.239	0.281	-0.236	-0.146	-0.120	-0.259	-0.287
Std.pet.col	-0.092	0.104	0.116	-0.182	-0.085	0.140	0.053	0.122	1	-0.014	-0.024	0.048	0.128	-0.010	0.058	-0.042	-0.014	0.268	0.107	-0.009	0.132	0.035	0.140	0.044	-0.072	-0.075	-0.287	-0.248	-0.157	-0.085	-0.140	-0.026	0.065	-0.137	-0.171	-0.192	-0.219	-0.165
Peg.pig	-0.009	0.050	-0.107	0.094	-0.027	-0.336	-0.084	-0.161	-0.014	1	0.248	0.023	-0.022	-0.058	0.357	-0.122	-0.110	0.186	-0.279	-0.338	-0.109	-0.235	0.235	-0.111	0.040	-0.078	-0.006	-0.050	-0.028	0.186	-0.128	0.303	-0.338	0.048	-0.332	-0.244	-0.094	-0.007
Flo.dis	-0.171	0.130	-0.115	0.034	-0.281	0.000	-0.066	-0.148	-0.024	0.248	1	0.017	-0.097	0.086	-0.006	0.023	0.046	0.096	-0.181	-0.169	-0.398	-0.019	0.019	-0.280	0.094	-0.313	0.193	-0.045	0.085	0.096	-0.102	0.129	-0.206	0.059	-0.050	-0.048	-0.183	-0.193
Lef.col	-0.127	0.334	-0.231	0.013	-0.101	-0.077	-0.023	0.008	0.149	0.023	0.017	1	0.227	0.234	0.063	0.040	-0.055	0.101	0.075	0.218	-0.171	-0.249	0.010	0.199	-0.531	-0.052	-0.195	-0.204	-0.293	0.217	0.150	0.126	-0.336	-0.040	-0.242	-0.332	-0.187	-0.119
Lft.lgth	0.419	0.235	-0.040	0.118	0.456	-0.031	0.392	-0.008	0.128	-0.022	-0.097	0.227	1	0.751	-0.049	0.553	0.004	0.238	0.117	-0.024	-0.020	0.430	0.184	0.192	-0.149	0.194	-0.229	0.050	-0.079	0.114	0.138	-0.137	-0.367	0.246	-0.232	-0.471	-0.058	0.037
Lft.wdth	0.501	0.304	-0.189	0.305	0.277	-0.170	0.356	-0.046	-0.010	-0.058	0.086	0.234	0.751	1	-0.194	0.371	-0.016	-0.070	0.215	0.135	-0.104	0.337	-0.055	0.343	-0.168	0.189	-0.092	-0.057	-0.110	0.126	0.284	-0.110	-0.442	0.252	-0.183	-0.429	-0.065	0.024
Lft.shp	0.013	0.018	-0.113	-0.156	-0.168	0.120	0.112	0.047	0.058	0.357	-0.006	0.063	-0.049	-0.194	1	0.011	0.010	-0.176	-0.073	-0.073	-0.102	-0.414	0.324	0.205	-0.065	-0.083	-0.002	-0.007	0.243	-0.006	-0.098	0.134	-0.120	-0.029	-0.009	0.024	0.114	0.292
Lft.src	0.007	0.149	-0.042	0.066	0.198	0.101	0.417	-0.044	-0.042	-0.122	0.023	0.040	0.553	0.371	0.011	1	0.492	0.183	-0.175	-0.013	-0.212	0.176	0.075	0.045	-0.289	-0.183	-0.162	-0.223	-0.191	-0.325	0.344	0.000	0.038	-0.128	-0.040	-0.014	-0.164	-0.182
Lft.mgn	-0.197	0.134	0.056	-0.196	-0.065	0.000	0.415	0.059	-0.014	-0.110	0.046	-0.055	0.004	-0.016	0.010	0.492	1	0.165	-0.208	-0.252	0.070	0.102	0.068	-0.272	-0.010	-0.373	0.135	-0.121	-0.076	-0.110	0.212	0.000	0.099	-0.279	-0.076	0.075	-0.210	-0.262
Lft.tip	-0.009	-0.006	0.033	0.040	0.147	-0.202	0.258	-0.308	0.268	0.186	0.096	0.101	0.238	-0.070	-0.176	0.183	0.165	1	-0.132	-0.249	-0.156	0.101	0.067	-0.142	-0.159	0.024	-0.173	0.010	-0.170	0.321	-0.084	0.008	-0.292	-0.068	-0.299	-0.402	-0.207	-0.223
Dys.50%fwg	0.321	-0.138	-0.196	0.256	0.193	-0.364	0.037	0.111	0.107	-0.279	-0.181	0.075	0.117	0.215	-0.073	-0.175	-0.208	-0.132	1	0.250	0.356	0.327	-0.145	0.090	0.075	0.409	0.072	0.355	0.112	0.161	0.452	-0.080	-0.426	0.350	0.196	-0.100	0.363	0.365
Dys.mty	-0.067	0.014	-0.238	0.289	-0.038	0.088	0.007	-0.250	-0.009	-0.338	-0.169	0.018	-0.024	0.135	-0.073	-0.013	-0.252	-0.249	0.250	1	-0.049	0.176	0.068	0.216	-0.266	0.027	0.087	-0.156	0.074	-0.160	0.271	0.193	0.077	0.211	0.223	0.210	0.131	0.207
Chlo.ctn	0.054	-0.431	0.284	0.029	0.163	-0.426	-0.044	0.035	0.132	-0.109	-0.398	-0.171	-0.020	-0.104	-0.102	-0.212	0.070	-0.156	0.356	-0.049	1	0.374	0.098	-0.360	0.259	0.124	0.087	0.407	0.139	0.055	0.005	0.140	0.125	0.325	0.296	0.212	0.450	0.201
Bch.dty	0.310	-0.192	0.208	0.334	0.358	-0.167	0.324	0.036	0.035	-0.235	-0.019	-0.249	0.430	0.337	-0.414	0.176	0.102	0.101	0.327	0.176	0.374	1	0.250	-0.213	0.270	0.152	0.083	0.296	0.187	0.101	0.401	0.000	-0.132	0.307	0.076	-0.123	0.080	0.018
Nod.cap	0.034	-0.219	0.138	-0.046	0.214	0.167	0.099	-0.036	0.140	0.235	0.019	0.010	0.184	-0.055	0.324	0.075	0.068	0.067	-0.145	-0.066	0.098	0.250	1	-0.028	0.160	0.101	0.124	0.074	0.457	0.067	0.087	0.305	-0.128	0.306	0.156	-0.037	0.178	0.249
Lef.are	0.472	0.299	-0.267	-0.013	0.051	0.042	0.000	0.114	0.044	-0.111	-0.280	0.199	0.192	0.343	0.205	0.045	-0.272	-0.142	0.090	0.216	-0.360	-0.213	-0.028	1	-0.267	0.280	-0.262	-0.093	0.057	0.103	0.184	-0.216	-0.002	-0.089	-0.113	-0.269	-0.036	0.195
Pod.csn	0.054	-0.150	0.235	-0.058	-0.001	0.000	-0.399	0.193	-0.072	0.040	0.094	-0.531	-0.149	-0.168	-0.065	-0.289	-0.010	-0.159	0.075	-0.266	0.259	0.270	0.160	-0.267	1	0.097	0.012	0.283	0.235	0.089	-0.348	-0.251	0.170	0.061	-0.002	-0.003	0.136	0.147
Num.sd.pod	0.510	-0.238	0.207	0.251	0.436	-0.152	-0.169	0.033	-0.075	-0.078	-0.313	-0.052	0.194	0.189	-0.083	-0.183	-0.373	0.024	0.409	0.027	0.124	0.152	0.101	0.280	0.097	1	0.306	0.577	0.207	0.229	0.142	-0.266	-0.185	0.395	0.382	-0.061	0.578	0.504
Txt.pod.src	0.040	-0.300	-0.011	0.103	0.021	-0.083	-0.026	-0.253	-0.287	-0.006	0.193	-0.195	-0.229	-0.092	-0.002	-0.162	0.135	-0.173	0.072	0.087	0.087	0.083	0.124	-0.262	0.012	0.306	1	0.379	0.442	0.161	0.071	-0.081	0.009	0.506	0.592	0.410	0.552	0.495
Pod.bk	0.468	-0.353	0.174	0.183	0.399	-0.384	-0.142	0.097	-0.248	-0.050	-0.045	-0.204	0.050	-0.057	-0.007	-0.223	-0.121	0.010	0.355	-0.156	0.407	0.296	0.074	-0.093	0.283	0.577	0.379	1	0.332	0.368	0.018	-0.018	-0.055	0.506	0.389	0.129	0.612	0.395
Pod.ret	0.090	-0.408	0.039	-0.116	0.023	0.140	0.087	-0.010	-0.157	-0.028	0.085	-0.293	-0.079	-0.110	0.243	-0.191	-0.076	-0.170	0.112	0.074	0.139	0.187	0.457	0.057	0.235	0.207	0.442	0.332	1	0.208	-0.052	0.222	0.087	0.476	0.418	0.235	0.466	0.520
Teg.asp	0.269	-0.116	-0.107	0.091	0.147	-0.336	0.087	-0.161	-0.085	0.186	0.096	0.217	0.114	0.126	-0.006	-0.325	-0.110	0.321	0.161	-0.160	0.055	0.101	0.067	0.103	0.089	0.229	0.161	0.368	0.208	1	-0.055	-0.090	-0.334	0.410	0.085	-0.150	0.312	0.352
Teg.col	0.192	0.091	-0.255	0.327	0.324	-0.325	0.324	-0.029	-0.140	-0.128	-0.102	0.150	0.138	0.284	-0.098	0.344	0.212	-0.084	0.452	0																		

Abstract

The knowledge and characterization of plant genetic resources are major challenges for our country to protect and enhance our genetic heritage. Peanut (*Arachis hypogaea* L) is one of the cultivated plants with a narrow genetic base, hence the interest in prospecting, rescuing, and characterizing germplasm of this species. The present study aimed to assess, for the first time, the genetic diversity and population structure of Algerian peanut accessions originated from four geographic regions in the north and south of the country using 40 agro-morphological descriptors, 11 microsatellite markers and seed storage proteins. Findings showed a high genetic diversity between studied accessions for all the markers and confirmed the presence of two subspecies of *A. hypogaea* in the studied collection results confirm also the important role of conarachine I fraction to distinguished between these subspecies. Furthermore, PCA results were revealed that leaflet size (length and width), seed shape and size, oil content, and branching pattern were the principal characters to discriminate the screened *A. hypogaea* accessions. Besides that, molecular analysis was exhibited 86 alleles with a mean number of 7.545 alleles per locus. Genetic structure analysis showed a strong population at K=2, separating accessions according to their geographic origin (North and south) with some exceptions. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) results were consistent with the results from the structure and PCA analysis dividing the studied collection into two clusters based on the subspecies affiliation of accessions. Moreover, Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed high genetic variation within individuals (90.7%) and low genetic differentiation between subspecies (10,3%) and among populations (8.9%).

On the other hand, peanut is accounted as one of the most cause of food allergy and anaphylaxis choc. Despite this, studies of peanut allergy didn't make the subject of intensive interest in Algeria. The objective of this research, was to evaluate the allergenicity of six peanut accessions using Balb/c mouse model. Serum specific IgE, IgG and IgG1 antibodies against peanut proteins were presented a high level. Furthermore, the histological analysis of jejunal sections were showed a lot of damages and inflammatory cells infiltration. These results were traduced the success of sensitized protocol used. Findings reports also that accessions belonging to the subspecies *hypogaea* especially Timimoune and El Oued 1 were the most hypoallergenic accessions compared with those belonging to the *fastigiata* subspecies.

During the different parts of this research Saharan Algerian peanut accessions were presented the best characteristics, namely agro-morphological traits and hypoallergenic character. Thus, we suggest the use of these accessions for cultivation and industry in order to benefit of their agronomical quality and fighting against peanut allergy problem.

Key words: *Arachis hypogaea*, Genetic diversity, Morphological traits, SDS-PAGE, SSR markers, Mouse model, Allergenicity, Algeria.

ملخص

تمثل معرفة وتصنيف الموارد الوراثية النباتية تحدياً كبيراً للبلدان من أجل حماية وتعزيز تراثها الجيني. الفول السوداني هو أحد النباتات المزروعة التي تمتاز بقاعدة وراثية فقيرة مما يدعو إلى الاهتمام أكثر بالبحث في هذا المجال من أجل الكشف عن التنوع الوراثي الموجود وحفظه وتصنيفها. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التنوع الجيني وهيكلية الأفراد النباتية للفول السوداني التي تزرع في أربع مناطق جغرافية في شمال وجنوب البلاد باستخدام 40 واصفاً مورفولوجياً، 11 محدد SSR بالإضافة إلى البروتينات المخزنة في حبات الفول السوداني. لقد أظهرت نتائج هذه الدراسة تنوعاً وراثياً كبيراً بين الأفراد المدروسة بالنسبة لكل المحددات. كما تؤكد النتائج وجود تحت نوعين داخل المجموعة المدروسة، تشير النتائج أيضاً إلى الدور المهم الذي تلعبه بروتينات Conarachine I في التمييز بين تحت الأنواع المدروسة. أظهرت نتائج تحاليل ال ACP أن حجم الورقة (الطول والعرض)، شكل وحجم البذور، المحتوى من المواد الدهنية والنوع التفرعي هم أكثر المحددات القادرة على التمييز بين الأفراد المدروسة. بالإضافة إلى ذلك، أظهر التحليل الجزيئي وجود 86 أليل بمعدل 7.545 أليل لكل موضع. كما أظهر التحليل الهيكلي للأفراد احتمالية كبيرة ($k=2$) وفصل الأفراد وفقاً لأصلها الجيوغرافي (الشمال والجنوب) مع وجود بعض الاستثناءات.

أظهرت نتائج تحليل ال UPGMA توافقاً مع نتائج الهيكلة وتحليل ال ACP حيث قسمت هذه الأخيرة مجموع الأفراد المدروسة إلى مجموعتين بناءً على انتماء الأفراد إلى تحت الأنواع. بالإضافة إلى ذلك، كشفت نتائج ال AMOVA عن تباين جيني مرتفع داخل الأفراد (90,7%) وتباين جيني منخفض بين تحت الأنواع (10,3%) وبين المجموعات النباتية (8,9%).

من جهة أخرى، يعتبر الفول السوداني أحد الأسباب الرئيسية للحساسية الغذائية وصدمة الحساسية. على الرغم من ذلك، لم تكن الدراسات حول حساسية الفول السوداني موضع اهتمام مكثف في الجزائر. الهدف من هذا البحث هو تقييم الحساسية لستة أفراد من الفول السوداني باستخدام نموذج فأر Balb/c. أظهر تحليل الأجسام المضادة IgE, IgG و IgG1 لبروتينات الفول السوداني تراكيز مرتفعة. علاوة على ذلك، أظهر التحليل النسيجي للمقاطع المعوية العديد من الأضرار وتسلسل للخلايا الالتهابية. تعكس هذه النتائج نجاح بروتوكول التحساس المستخدم. تشير النتائج أيضاً إلى أن الأفراد التي تنتمي إلى تحت نوع *hypogaea*، تحديداً أفراد تيميمون والوادي 1، هي أقل قدرة على توليد استجابة تحسسية مقارنة بتلك التي تنتمي إلى تحت نوع *fastigiata*.

خلال المراحل المختلفة لهذا البحث، ابرزت أفراد الفول السوداني القادمة من ولاية الوادي أفضل الخصائص الزراعية إضافة إلى قدرة ضعيفة على توليد استجابة تحسسية. وبالتالي، فإننا نقترح استخدام هذه الأفراد للزراعة والصناعة للاستفادة من جودتها الزراعية ولمكافحة مشكلة حساسية الفول السوداني.

الكلمات المفتاحية: *Arachis hypogaea*، المحددات المورفولوجية، SDS-PAGE، SSR، التنوع الجيني، الحساسية، نموذج حيواني، الجزائر.

Résumé

La connaissance et la caractérisation des ressources phytogénétiques sont des enjeux majeurs pour notre pays afin de protéger et valoriser notre patrimoine génétique. L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) fait partie des plantes cultivées avec une base génétique étroite, d'où l'intérêt de prospecter, sauver et caractériser le matériel génétique de cette espèce. La présente étude avait comme objectif l'évaluation, pour la première fois, de la diversité génétique et la structuration d'une population des accessions d'arachide algériennes originaires de quatre régions géographiques du nord et du sud du pays en utilisant 40 descripteurs agro-morphologiques, 11 marqueurs microsatellites et les protéines de réserve. Les résultats ont montré une grande diversité génétique entre les accessions étudiées pour tous les marqueurs, et ont confirmé la présence de deux sous-espèces d'*A. hypogaea* dans la collection étudiée. Les résultats confirment également le rôle important de la fraction conarachine I pour distinguer ces sous-espèces. De plus, les résultats de l'ACP ont révélé que la taille des folioles (longueur et largeur), la forme et la taille des graines, la teneur en huile et le mode d'embranchement étaient les principaux caractères permettant de discriminer les accessions d'*A. hypogaea* étudiées. En plus de cela, l'analyse moléculaire a montré la présence de 86 allèles avec un nombre moyen de 7.545 allèles par locus. L'analyse de la structuration a montré une forte probabilité à $K=2$, séparant les accessions selon leur origine géographique (Nord et Sud) avec quelques exceptions. Les résultats de la méthode de groupe de paires non pondérées avec moyennes arithmétiques (UPGMA) étaient cohérents avec les résultats de la structuration et de l'analyse ACP divisant la collection étudiée en deux groupes en fonction de l'affiliation des accessions aux sous-espèces. De plus, l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a révélé une forte variation génétique au sein des individus (90,7 %) et une faible différenciation génétique entre les sous-espèces (10,3 %) et entre les populations (8,9 %).

Parallèlement, l'arachide est considérée comme l'une des principales causes d'allergies alimentaires et du choc anaphylactique. Malgré cela, les études sur l'allergie à l'arachide n'ont pas fait l'objet d'un intérêt intensif en Algérie. L'objectif de cette recherche était d'évaluer l'allergénicité de six accessions d'arachide en utilisant un modèle de souris Balb/c. Le dosage des anticorps IgE, IgG et IgG1 spécifiques aux protéines d'arachide a présenté des concentrations élevées. De plus, l'analyse histologique des coupes jéjunales a montré de nombreux dommages et infiltrations des cellules inflammatoires. Ces résultats reflètent le succès du protocole de sensibilisation utilisé. Les résultats rapportent également que les accessions appartenant à la sous-espèce *hypogaea*, en particulier les accessions Timimoune et El Oued 1, étaient les accessions les plus hypoallergéniques par rapport à celles appartenant à la sous-espèce *fastigiata*.

Au cours des différentes parties de cette recherche, les accessions d'arachide sahariennes ont présenté les meilleures caractéristiques, à savoir les traits agro-morphologiques et le caractère hypoallergénique. Ainsi, nous proposons l'utilisation de ces accessions pour la culture et l'industrie afin de bénéficier de leur qualité agronomique et lutter contre le problème d'allergie à l'arachide.

Mots clés : *Arachis hypogaea*, Diversité génétique, Traits morphologiques, SDS-PAGE, Marqueurs SSR, Modèle murin, Allergénicité, Algérie.

Année universitaire : 2021/2022

Présentée par : DJEGHIM Hanane

Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle en Biochimie
Option : Biochimie / Nutrition

Thème : Diversité génétique des variétés d'arachides (*Arachis hypogaea*) en Algérie. Recherche et caractérisation de leurs allergènes par l'approche protéomique

Résumé

La connaissance et la caractérisation des ressources phytogénétiques sont des enjeux majeurs pour notre pays afin protéger et valoriser notre patrimoine génétique. L'arachide (*Arachis hypogaea* L.) fait partie des plantes cultivées avec base génétique étroite, d'où l'intérêt de prospecter, sauver et caractériser le matériel génétique de cette espèce. La présente étude avait comme objective l'évaluation, pour la première fois, de la diversité génétique et la structuration d'une population des accessions d'arachide algériennes originaires de quatre régions géographiques du nord et du sud du pays en utilisant 40 descripteurs agro-morphologiques, 11 marqueurs microsatellites et les protéines de réserve. Les résultats ont montré une grande diversité génétique entre les accessions étudiées pour tous les marqueurs, et ont confirmé la présence de deux sous-espèces d'*A. hypogaea* dans la collection étudiée. Les résultats confirment également le rôle important de la fraction conarachine I pour distinguer ces sous-espèces. De plus, les résultats de l'ACP ont révélé que la taille des folioles (longueur et largeur), la forme et la taille des graines, la teneur en huile et le mode d'embranchement étaient les principaux caractères permettant de discriminer les accessions d'*A. hypogaea* étudiées. En plus de cela, l'analyse moléculaire a montré la présence de 86 allèles avec un nombre moyen de 7.545 allèles par locus. L'analyse de la structuration a montré une forte probabilité à $K=2$, séparant les accessions selon leur origine géographique (Nord et Sud) avec quelques exceptions. Les résultats de la méthode de groupe de paires non pondérées avec moyennes arithmétiques (UPGMA) étaient cohérents avec les résultats de la structuration et de l'analyse ACP divisant la collection étudiée en deux groupes en fonction de l'affiliation des accessions aux sous-espèces. De plus, l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a révélé une forte variation génétique au sein des individus (90,7 %) et une faible différenciation génétique entre les sous-espèces (10,3 %) et entre les populations (8,9 %). Parallèlement, l'arachide est considérée comme l'une des principales causes d'allergies alimentaires et du choc anaphylactique. Malgré cela, les études sur l'allergie à l'arachide n'ont pas fait l'objet d'un intérêt intensif en Algérie. L'objectif de cette recherche était d'évaluer l'allergénicité de six accessions d'arachide en utilisant un modèle de souris Balb/c. Le dosage des anticorps IgE, IgG et IgG1 spécifiques aux protéines d'arachide a présenté des concentrations élevées. De plus, l'analyse histologique des coupes jéjunales a montré de nombreux dommages et infiltrations des cellules inflammatoires. Ces résultats reflètent le succès du protocole sensibilisation utilisé. Les résultats rapportent également que les accessions appartenant à la sous-espèce *hypogaea*, en particulier les accessions Timimoune et El Oued 1, étaient les accessions les plus hypoallergéniques par rapport à celles appartenant à la sous-espèce *fastigiata*. Au cours des différentes parties de cette recherche, les accessions d'arachide saharienne ont présenté les meilleures caractéristiques, à savoir les traits agro-morphologiques et le caractère hypoallergénique. Ainsi, nous proposons l'utilisation de ces accessions pour la culture et l'industrie afin de bénéficier de leur qualité agronomique et lutter contre le problème d'allergie à l'arachide.

Mots clés : *Arachis hypogaea*, Diversité génétique, Traits morphologiques, SDS-PAGE, Marqueurs SSR, Modèle murin, Allergénicité, Algérie.

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie Université Frères Mentouri Constantine 1

Mots clés : *Arachis hypogaea*, Diversité génétique, Traits morphologiques, SDS-PAGE, Marqueurs SSR, Modèle murin, Allergénicité, Algérie.

Jury d'évaluation :

Président : HAMIDECHI M.A Prof. Université Frères Mentouri Constantine 1
Directeur de thèse : KHELIFI D. Prof. Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie
Co-directeur : BELLIL I. MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1
Examineur : SOBHI W. Prof. Université Ferhat Abbes Setif 1
Examineur : BECHKRI S. MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1