

Zeitschrift: Saussurea : journal de la Société botanique de Genève
Herausgeber: Société botanique de Genève
Band: 6 (1975)

Artikel: Chimie taxonomique : analyse critique de l'utilisation des caractères biochimiques des protéines de graines : exemple de variabilité d'origine technique apporté par une étude cinétique de la dialyse

Autor: Miège, Marie-Noëlle
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-1099059>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 17.04.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Chimie taxonomique: analyse critique de l'utilisation des caractères biochimiques des protéines de graines. Exemple de variabilité d'origine technique apporté par une étude cinétique de la dialyse

MARIE-NOËLLE MIÈGE

Résumé

MIÈGE, M.-N. (1975). Chimie taxonomique: analyse critique de l'utilisation des caractères biochimiques des protéines de graines. Exemple de variabilité d'origine technique apporté par une étude cinétique de la dialyse. *Saussurea* 6: 153-169.

Présentation et discussion des critiques formulées à l'encontre de l'utilisation des caractères biochimiques, notamment ceux fournis par l'analyse des protéines des graines. La séparation, par dialyse, des albumines et globulines multiplie les caractères fournis par l'analyse mais augmente les risques d'interférence technique. La variabilité des données utilisées, quantitatives (proportions des différentes formes d'azote...) et qualitatives (électrophorétiques, enzymatiques...), est révélée par l'analyse d'albumines et de globulines obtenues à des durées variables; les conditions d'une séparation optimum sont précisées.

Abstract

MIÈGE, M.-N. (1975). Chemotaxonomy: critical analysis of the use of biochemical features from seed proteins. Example of variability from technical origin given by a kinetic study of the dialysis. *Saussurea* 6: 153-169. In French.

Critics against the utilization of biochemical features, and specially of those obtained by analysis of seed proteins, are presented and discussed. The separation of albumins and globulins, obtained by dialysis, increases the features given by analysis, but also increases the risks of technical interference. The variability of quantitative and qualitative data is shown by analysing albumins and globulins obtained at various stages; the conditions necessary for an optimum separation are specified.

Mots clés: chimie taxonomique; protéines de graines; globulines de Légumineuses, albumines, protéases, inhibiteurs de la trypsine, dialyse.

I. Analyse des critiques formulées contre la chimio-taxonomie. Validité des caractères des protéines des graines

1. Critiques formulées envers la chimie taxonomique

Le recours aux caractères biochimiques des plantes pour compléter, préciser ou infléchir les positions des systématiciens dans leurs études taxonomiques est devenu classique. C'était, pour les botanistes faire preuve de logique et de dynamisme que de vouloir bénéficier des progrès de la biologie si considérables depuis les vingt dernières années. Mais des écueils guettaient la réussite d'une symbiose

entre botanistes et biochimistes. Le premier est un effet de saturation: "les botanistes croûlent déjà, rappelle HEYWOOD (1973), sous le poids de spécimens et des données accumulées". Il apparaît alors à l'évidence qu'ajouter de nouvelles données, si intéressante qu'en soit la provenance, ne peut qu'alourdir la tâche des taxonomistes. Mais cet inconvénient s'atténue si ce nouvel apport accélère le renouveau de l'effort taxonomique par une confrontation de tous les caractères possibles conduisant à une hiérarchisation toujours meilleure des critères de classification.

Mais il y a à l'encontre des caractères biochimiques un grief plus grave, c'est une suspicion de leur validité. Cette suspicion prend son origine dans la distance qui sépare biochimiste et botaniste. Les biochimistes ne sont souvent intéressés que par la substance qu'ils extraient sans considération pour le fonctionnement général de l'organisme qui l'élabore et encore moins pour la situation de cet organisme dans l'univers végétal auquel il appartient. Les botanistes considèrent donc avec méfiance les biochimistes qui se veulent systématiciens, leur reprochant notamment d'être de piètres nomenclaturistes. Si la désinvolture nomenclaturale du biochimiste s'accompagne d'une interprétation hâtive de ses résultats, il peut arriver à des "non sens" qu'HEYWOOD (1973) évoque ainsi: "we are all familiar with cases where the same plant is listed twice under different names (and with different chemical constituents!)".

Cette critique est certainement justifiée. Elle conduit les chimistes taxonomistes ou bien à douter de la valeur des données toujours plus précises et plus nombreuses fournies par l'analyse des constituants des organismes, ou bien à passer au crible leurs méthodes de travail pour y déceler les causes de telles erreurs.

Les constituants chimiques utilisés dans les exemples incriminés sont-ils ceux issus du métabolisme secondaire? Heywood ne le précise pas. Ces substances furent les plus utilisées par les taxonomistes jusqu'à maintenant à tel point que, dans une revue des progrès de la chimie taxonomique, qu'il appelle "taxonomie moléculaire", ERDTMAN (1971) délaisse la valeur taxonomique des caractères fournis par l'analyse des protéines.

J. MIÈGE (1975a), faisant récemment l'histoire de la chimie taxonomique, relate le démarrage prudent de la "protéino-taxonomie", contestée tout d'abord puis qui connut, à partir des années 60, un développement explosif. Cet auteur justifie le choix des graines comme matériel se prêtant le mieux à une telle étude, et le bilan qu'il établit de la contribution de l'analyse des protéines de graines à la taxonomie apparaît nettement positif. Un domaine qui a particulièrement bénéficié de cette contribution est celui des recherches généalogiques dans des groupes cultivés, qu'il s'agisse des blés ou de cultures vivrières telles, par exemple, les Dioscorées dont l'ampleur de la variation génétique est à la mesure de l'étendue et de la diversité des populations qui les cultivent; de telles études rejoignent des préoccupations d'ordre économique.

Les protéines sont souvent utilisées après analyses électrophorétiques des extraits, par comparaison des protéinogrammes généraux. Mais, pour les recherches à caractères génétiques, les disjonctions alléliques sont souvent mieux appréciées par l'utilisation d'enzymogrammes. Ainsi, pour établir les liens de parenté entre des variétés de maïs, SCANDALIOS (1969) utilise les amylases, BECKMAN & al. (1964) les catalases, SCHWARTZ & al. (1965) les estérases. Il ressort de ces études que les zymogrammes sont précieux pour établir des discriminations aux niveaux spécifique, variétal ou simplement génique.

Cependant, pour établir les relations inter-spécifiques entre les *Adansonia*, J. MIÈGE (1975b) utilisera des protéinogrammes généraux mais alors relatifs à des familles protéiques isolées et non à des extraits bruts. Pour analyser les protéines des graines, on peut, en effet, soumettre à la migration électrophorétique un extrait global contenant l'ensemble des protéines solubles dans le solvant choisi, souvent une solution aqueuse tamponnée à faible force ionique. C'est la technique généralement adoptée, elle conduit à des diagrammes très chargés que les auteurs comparent, utilisant des différences parfois assez ténues dans les positions ou intensités des bandes révélées.

Aussi les auteurs deviennent-ils de plus en plus nombreux à ajouter, aux données fournies par l'analyse des extraits bruts, celles tirées de l'analyse de familles chimiques séparées après l'extraction. Ainsi, ALTOSAAR & al. (1974) analysent les albumines de 20 taxons de *Lasthenia*. M.-N. MIÈGE (1971) compare 7 taxons de *Leucanthemum* par l'analyse des albumines et des globulines. MONOD & al. (1972) constatent que les protéinogrammes d'extraits bruts de 10 cultivars de riz permettent des distinctions variétales mais que ces distinctions sont confirmées et accentuées par l'analyse des familles protéiques isolées, notamment les prolamines et glutélines.

2. Validité des caractères fournis par l'analyse des protéines de graines: causes de variabilité

La cohérence des résultats rapportés, la conformation des distinctions qu'ils autorisent aux grandes lignes des classifications établies, semblent justifier pleinement l'intérêt des chimio-taxonomistes pour les protéines de graines. Mais une suspicion, légitime sans doute, entoure encore la validité des résultats qui découlent de telles analyses. Et le doute provient du peu d'information que nous avons sur les conséquences que des facteurs non génétiques exercent sur les caractères révélés des protéines. Ces facteurs peuvent être de trois sortes: écologiques, physiologiques, techniques.

Facteurs écologiques: quelle répercussion peuvent avoir les variations climatiques ou géographiques sur les protéines des graines d'un même taxon? On ne peut encore répondre avec précision. Mais J. MIÈGE (1975b) fait une intéressante constatation: alors que les 7 espèces d'*Adansonia* qu'il analyse se distinguent très nettement par les caractères électrophorétiques de leurs albumines et globulines, il observe une frappante analogie entre deux *Adansonia digitata*, l'un de Côte-d'Ivoire, l'autre du Sénégal.

Facteurs physiologiques: un point semble n'avoir encore pas été résolu et pourtant paraît d'une importance primordiale: quel impact a, sur les caractères protéiques révélés, le mode de conservation des graines ainsi que l'état de leur maturité au moment de la récolte? Nous étudions ce problème dans notre service et pourrons prochainement faire part de résultats échelonnés sur quatre ans.

Facteurs techniques: nous avons vu que l'isolement de familles protéiques permet d'amplifier de beaucoup la portée des résultats d'analyse protéique. Encore faut-il que les techniques supplémentaires exigées n'aggravent pas les causes de perturbation sur les caractères révélés.

Ayant nous-mêmes adopté la séparation des familles protéiques préalablement à leur caractérisation pour des études à la fois biologiques et taxonomiques, nous devons commencer par déterminer quels facteurs, parfois minimes et propres à chaque opérateur, étaient susceptibles d'entraver la reproductibilité des résultats. L'étape nécessaire à l'obtention de deux familles importantes de protéines, les albumines et les globulines, implique une dialyse; nous avons donc recherché systématiquement les causes de variabilité liées à cette technique.

II. Influence des conditions de dialyse sur les proportions relatives et les propriétés des protéines salino-solubles isolées des cotylédons de graines de Dolique (*Lablab purpureus* (L.) Sweet

1. Présentation

Pour séparer albumines et globulines, une dialyse s'impose car il n'est pas possible de réaliser une extraction fractionnée de ces deux familles du fait que l'eau solubilise une bonne partie des globulines (M.-N. MIÈGE, 1970). D'autre part, les fractionnements des extraits par filtration sur gels ou résines à effets de tamisage moléculaire ou d'échanges d'ions ne permettent pas une séparation nette des albumines et des globulines comme le fait la dialyse.

La dialyse peut être pratiquée sur l'extrait brut ou sur les protéines préalablement précipitées de l'extrait par saturation de celui-ci en sulfate d'ammonium. Les auteurs qui choisissent cette deuxième solution se proposent généralement l'isolement d'une protéine précise (WRIGHT & BOULTER, 1974; PUSZTAI & WATT, 1970...). Mais pour recenser le plus grand nombre possible de protéines et utiliser leurs caractères qualitatifs et quantitatifs comme données taxonomiques, la dialyse de l'extrait brut paraît préférable (MIÈGE & MIÈGE, 1971). Dans ce cas les durées de dialyse adoptées varient selon les auteurs. Ainsi, HOBDAÏ & GILES (1973) isolent les globulines de soja par dialyse du surnageant obtenu à 3000 g une nuit contre l'eau du robinet. JUO & STOTZKY (1970) isolent celles de *Phaseolus vulgaris* par dialyse 24 heures à + 15°C contre l'eau du robinet suivie d'une dialyse de 16 heures à + 4°C contre l'eau distillée.

Dans le cas où l'eau de dialyse n'est pas renouvelée par écoulement continu, certains facteurs peuvent intervenir sur la qualité et la rapidité de la séparation (volume, fréquence des renouvellements, agitation...). Ces détails ne sont pas toujours précisés par les auteurs. Sous l'appellation "globulines" et "albumines" ils peuvent alors évoquer, dans leurs travaux, des protéines qualitativement et quantitativement différentes.

Nous allons montrer comment des variations minimes des modalités de la dialyse, qui permet d'isoler les deux familles protéiques principales des graines exalbuminées, peuvent fausser l'interprétation des données.

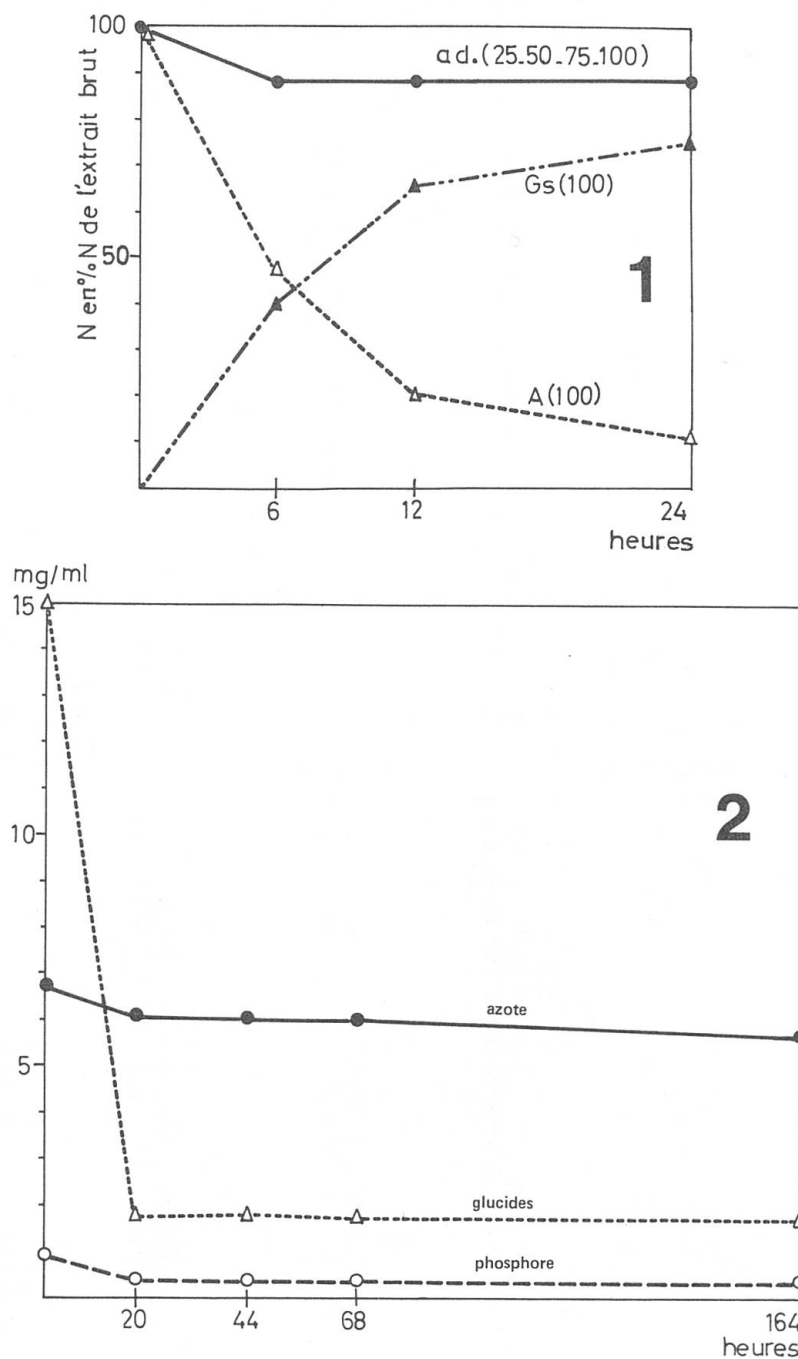
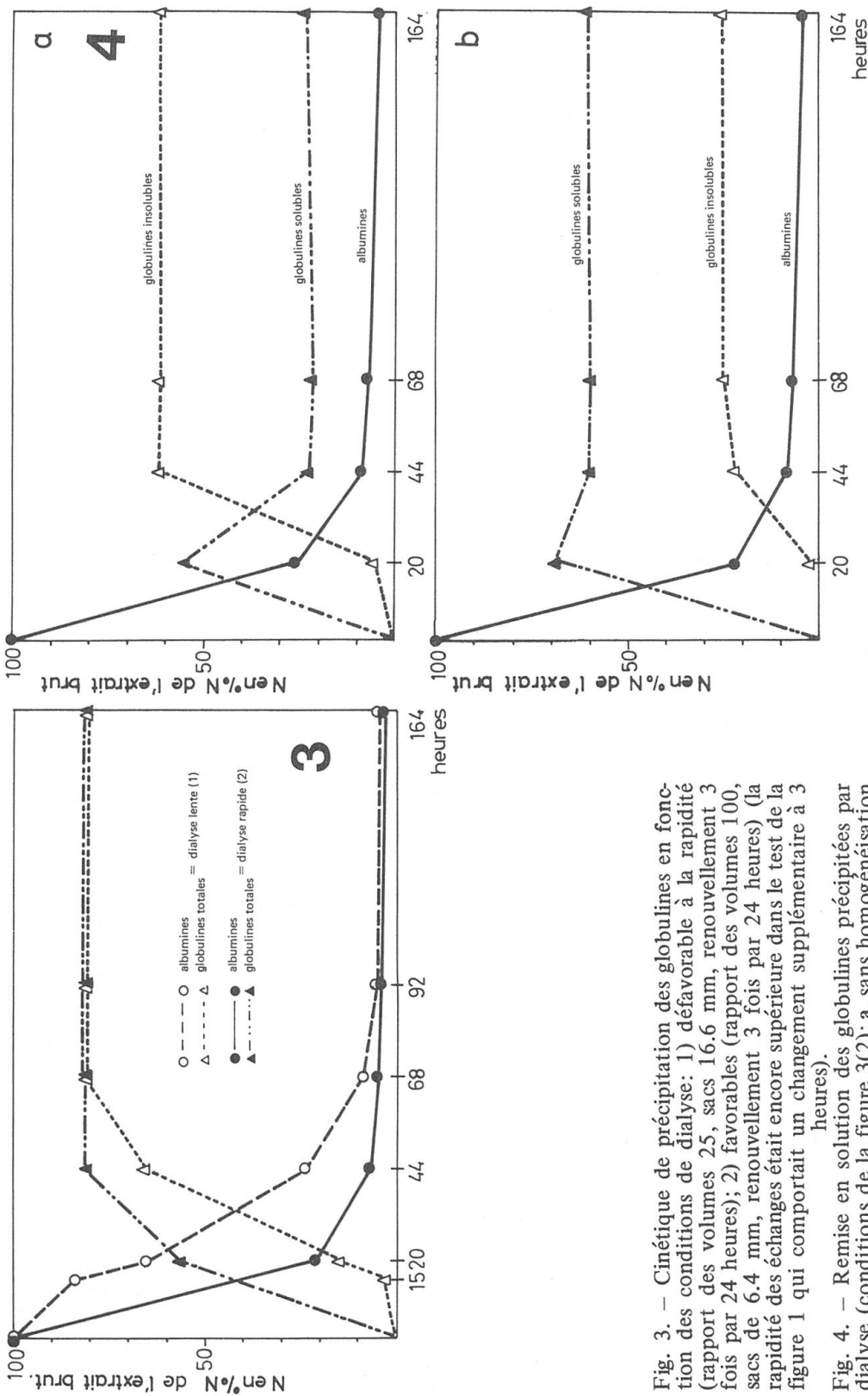


Fig. 1. — Cinétique d'élimination des petites molécules azotées d'extraits soumis à des dialyses contre des volumes d'eau variables (rapports "volume d'eau/volume d'extrait" respectivement de 25-50-75-100); renouvellements: 1 fois à 6 heures, 3 fois à 12 heures, 4 fois à 24 heures. Abréviations: A = albumines; Gs = globulines solubles; ad = adialysat.

Fig. 2. — Cinétique d'élimination des molécules dialysables dans des conditions de dialyse rapide (appréciation atomique pour l'azote et le phosphore, moléculaire pour les glucides).



2. Résultats et discussion

Précisons une convention que nous adoptons pour uniformiser les désignations. Nous appelons "albumines" les substances contenues dans le surnageant de centrifugation après dialyse, quelle que soit la durée de celle-ci, et "globulines" les substances précipitées par la dialyse. Mais il est évident que ce qui s'appelle "albumines" après de brèves dialyses est en fait un mélange d'albumines et de globulines non encore précipitées.

a) *Élimination des petites molécules*

Des volumes d'extrait brut ont été soumis à des dialyses contre des volumes d'eau relatifs allant de 25 à 100 fois le volume à dialyser, la fréquence des renouvellements étant élevée et constante (fig. 1). On constate que l'élimination des molécules azotées dialysables est très rapide: dès 6 heures, quel que soit le volume d'eau relatif, elles sont toutes éliminées. Dès cet instant la précipitation des globulines est déjà sensible mais non totale, elle se poursuit progressivement ensuite.

Une dialyse prolongée favorisera-t-elle la dégradation par des enzymes hydrolytiques endogènes conduisant à l'élimination d'un nouveau lot de petites molécules? On constate (fig. 2) qu'une nouvelle perte, très faible, de molécules azotées s'observe effectivement entre 92 et 164 heures. En revanche, les molécules phosphorées et glucidiques sont toutes éliminées pendant les premières heures et ne subissent apparemment plus de dégradations. On remarque que la majorité des glucides extraits sont dialysables. On sait, en effet, que les réserves glucidiques macromoléculaires des graines de dolique sont représentées par de l'amidon insoluble dans l'eau froide.

b) *Séparation des albumines et des globulines*

Les résultats de deux séparations réalisées, pour l'une dans des conditions favorables à la rapidité d'élimination, pour l'autre dans des conditions moins favorables, révèlent (fig. 3) un retard de 24 heures, dans ce dernier cas, pour la séparation des albumines et des globulines. Ceci conduit à préciser ainsi les conditions de rapidité maximum: rapport de volumes supérieur à 50 (25 suffisant pour de très petits volumes), renouvellements 2 fois en 6 heures et ensuite 3 fois par jour, sacs à dialyse de faible diamètre (6.4 mm = 10 mm à plat).

c) *Remise en solution des globulines précipitées*

L'évolution des globulines pendant les 24 heures qui suivent leur précipitation massive est assez curieuse (fig. 4). Au début de cette précipitation, à 20 heures dans les conditions favorables à une séparation rapide, elles se redissolvent en presque totalité dans les solutions salines; mais 24 heures plus tard, une partie va résister à la remise en solution; pendant ces 24 heures il se produirait une transformation du précipité qui rend sa remise en solution plus difficile. L'homogénéisation au Potter, avec la solution saline, du précipité obtenu après dialyse améliore considérablement

la remise en solution (comparaison 4a-4b), néanmoins une porportion encore importante des globulines totales (30% environ) va résister à deux solubilisations successives (voir méthodes). Ces protéines encore mal définies que nous appelons "globulines insolubles" parce qu'elles ne se redissolvent plus dans les solutions salines, qui s'isolent entre 20 et 44 heures, sont-elles des albumines ou globulines solubles dénaturées ou bien de fausses globulines passées dans le surnageant d'extraction mais sédimentant après dialyse? D'autres approches permettront de préciser ce point.

A partir de 44 heures, on constate une stabilisation des taux de globulines solubles comme insolubles, ces dernières augmentant encore très faiblement.

d) Evolution des constituants de chaque famille protéique au cours de la dialyse

Les variations constitutionnelles au sein des familles protéiques isolées ont été appréciées par des analyses électrophorétiques (fig. 5 et 6) révélant la complexité

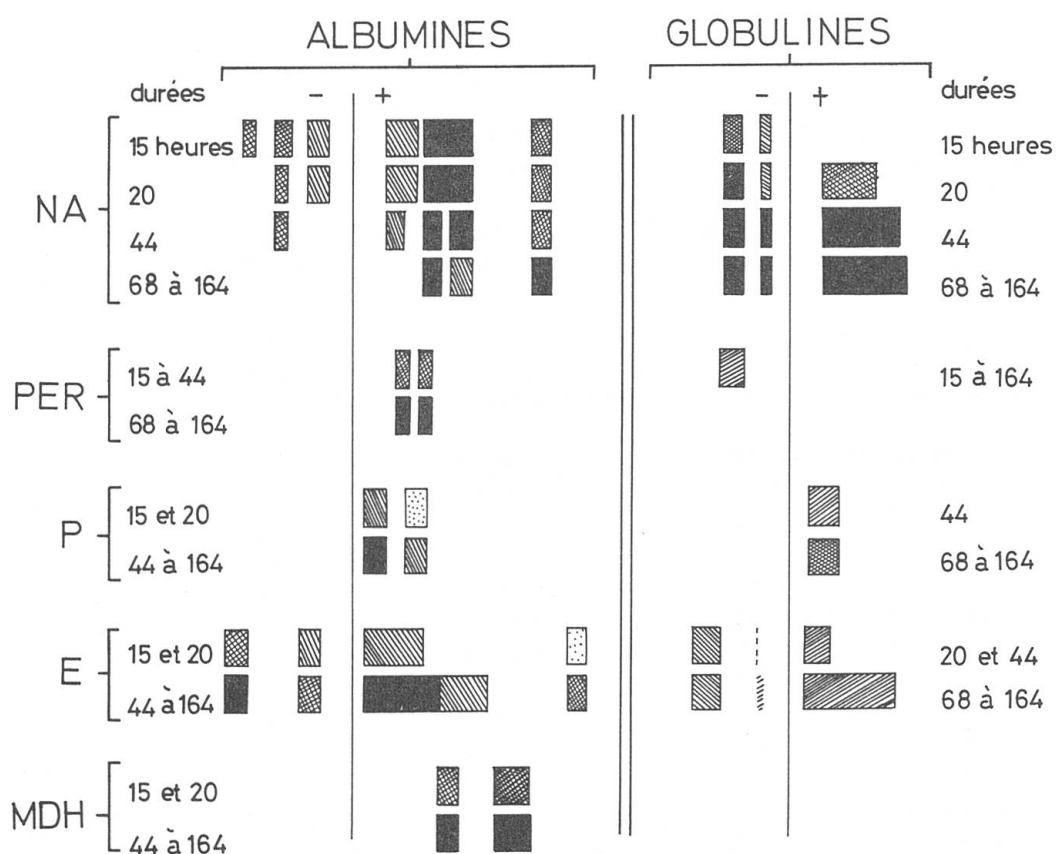


Fig. 5. — Schéma des diagrammes électrophorétiques en gel d'agarose reflétant la séparation des albumines et globulines au cours de la dialyse (conditions de la dialyse lente de la figure 3(1)) et l'évolution de certaines activités enzymatiques qui leur sont liées (la ligne verticale indique la position de départ). Abréviations: NA = noir amide; PER = peroxydases; P = phosphatases; MDH = malate-déshydrogénases.

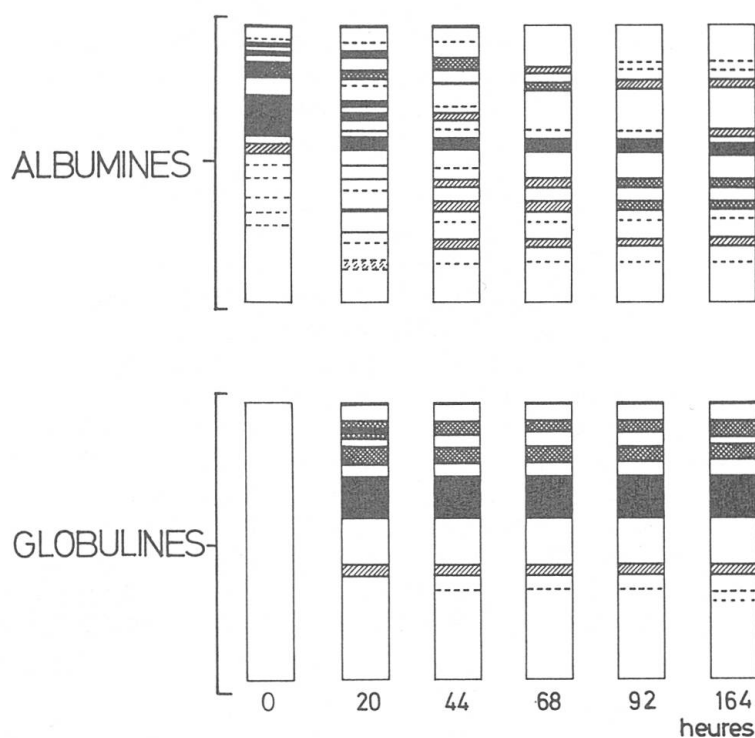


Fig. 6. — Schéma des diagrammes électrophorétiques (noir amide, pH 8.9) des albumines et globulines séparées dans les conditions de dialyse rapide de la figure 4b.

des albumines et globulines solubles et rendant compte de la séparation fractionnée des globulines selon le degré de stabilité de chaque fraction à faible force ionique. En outre, la proportion relative phosphore/azote a été précisée pour chaque famille.

Les altérations subies par les globulines solubles après de longues durées de dialyse n'affectent qu'une très faible proportion de ces protéines; elles modifient peu les diagrammes électrophorétiques (fig. 6) sur lesquels cependant un reflet d'altérations sélectives est fourni par de faibles différences d'intensité relative de coloration de certaines zones mineures. Les premières étapes, au contraire, donnent lieu à un isolement différentiel que l'on ne peut constater que sur les lames d'agarose (fig. 5) car il s'agit de la précipitation des fractions cathodiques. On ne saisit cet isolement différentiel que dans les cas de dialyse à vitesse d'échange réduite comme celle rapportée dans la figure 3 (courbe pointillée); dans cet exemple les fractions cathodiques sont isolées à 15 heures alors que la fraction anodique majeure est encore en solution.

Ces fractions basiques ne peuvent être observées, au pH où nous opérons, sur les diagrammes obtenus en gel de polyacrylamide; ceux-ci, en revanche, donnent une meilleure résolution des fractions anodiques. On retrouve sur les diagrammes de la figure 6, relatifs à une séparation plus rapide (celle de la figure 4b), la fraction globulinique majeure assortie d'un certain nombre de fractions moins importantes non distinctes sur agarose. Les progrès de la séparation albumines-globulines sont attestés par l'évolution des diagrammes albuminiques et globuliniques: les diagrammes deviennent stables après 44 heures encore que quelques zones mineures

albuminiques s'éliminent entre 44 et 68 heures; après cela, malgré la perte quantitative relativement importante subie par les albumines, leurs diagrammes ne changent plus que par l'importance relative d'une zone mineure.

e) *Evolution des activités enzymatiques et inhibitrices*

Celles des activités enzymatiques se prêtant à une révélation sur gels ont été suivies, sur les enzymogrammes, de manière à apprécier leur stabilité pendant des dialyses plus ou moins longues. La majorité des enzymes appartiennent aux albumines mais les globulines ont également certaines activités enzymatiques, hydrolasiques notamment (estérases, phosphatases, protéases). Les activités révélées sur les enzymogrammes (fig. 5) sont stables tout au long de la dialyse; l'augmentation des activités spécifiques albuminiques que traduit l'augmentation de coloration des zones actives reflète le départ progressif des globulines moins actives. On remarque que les globulines basiques très tôt précipitées ont une activité peroxydasique alors que les isoperoxydases albuminiques sont anodiques.

C'est sur les solutions albuminiques que l'activité protéolytique a été recherchée (vis-à-vis du substrat synthétique α -N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide [BAPA]).

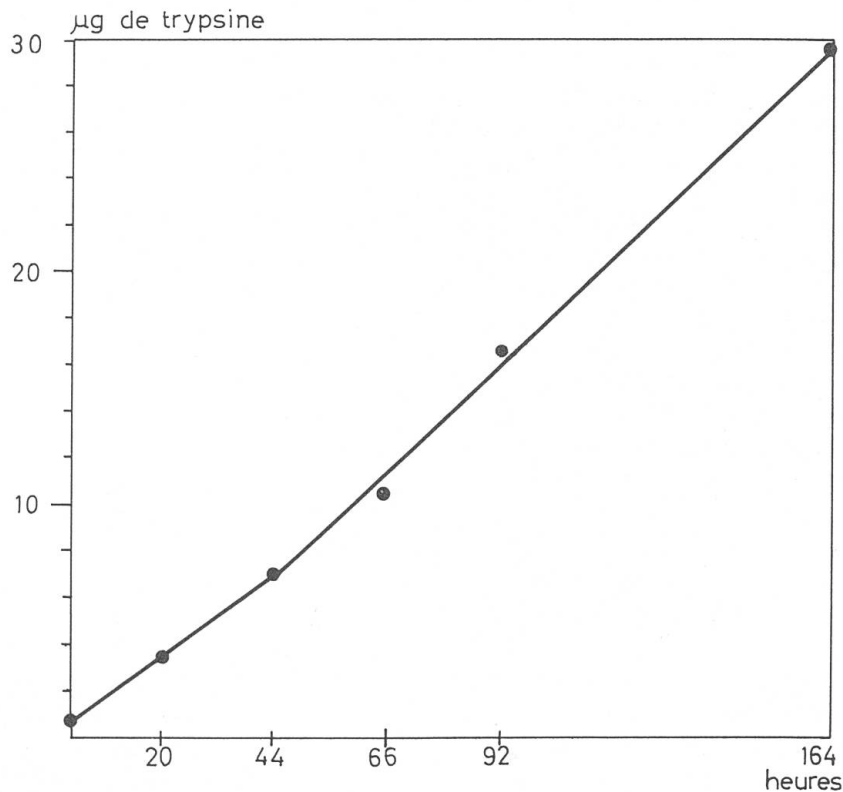


Fig. 7. — Evolution de l'activité BAPA-ase spécifique des albumines au cours de la dialyse (conditions de la figure 4b). L'activité est exprimée en quantité de trypsine produisant une activité équivalente à celle de 1 mg (Lowry) d'albumine.

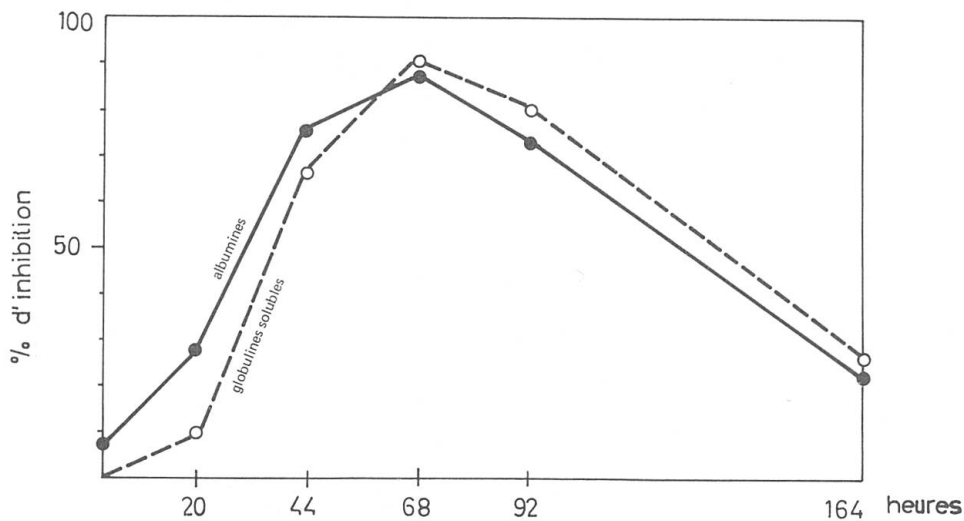


Fig. 8. — Evolution de l'activité spécifique anti-trypsine des protéines isolées au cours de la dialyse dans les conditions de la figure 4b. L'inhibition est exprimée en % d'inhibition de 20 μg de trypsine par 15 μg d'albumine, et par 400 μg de globulines solubles.

Nous avons, de plus, suivi l'activité inhibitrice des albumines et globulines vis-à-vis de l'activité BAPA-asiq de la trypsine (fig. 7 et 8).

Tout au long de la dialyse, l'activité spécifique BAPA-asiq de albumines augmente; au début cette augmentation dénote le départ des globulines dépourvues d'une telle activité. Au delà de 68 heures, alors que toutes les globulines sont éliminées, l'activité spécifique des albumines continue d'augmenter, elle est maximum au temps le plus long, à 164 heures; or, parallèlement, la quantité d'albumines restant en solution diminue, on peut donc en déduire que les BAPA-ases sont particulièrement stables.

Le comportement de l'activité anti-trypsine (fig. 8) est différent. Elle augmente pour les albumines comme pour les globulines mais seulement jusqu'à 68 heures. Chez les albumines, cette augmentation reflète le départ des globulines beaucoup moins inhibitrices (30 fois moins environ). Chez les globulines l'augmentation est considérable entre 20 et 44 heures; elle peut signifier que la perte de globulines solubles observée dans le même temps (fig. 4b) affecte des molécules non inhibitrices. Cette perte apparaît cependant insuffisante pour expliquer l'ampleur de l'augmentation de l'activité spécifique anti-trypsine. On peut supposer que la perte quantitative enregistrée est la résultante: d'une part, d'un apport de globulines solubles douées d'activité inhibitrice encore en solution à 20 heures (l'évolution des électrophorogrammes semble bien refléter le caractère incomplet de la séparation à 20 heures), d'autre part, d'une insolubilisation irréversible d'une partie des globulines précipitées réversiblement à 20 heures. On se trouverait alors devant le choix de stopper la dialyse à 20 heures au détriment de la pureté des albumines ou d'aller jusqu'à 44 heures au détriment de l'exhaustivité des globulines. Cette dernière solution pourrait être choisie si la combinaison des données indique que les albumines qui précipitent entre 20 et 44 heures sont bien des globulines solubles.

Après 68 heures, l'inhibition liée aux albumines comme aux globulines se dégrade très sensiblement. Ces baisses d'activité pourraient dénoter une digestion des molécules inhibitrices par les enzymes protéolytiques endogènes, à la faveur, par exemple, d'altérations moléculaires affectant les ponts disulfures des inhibiteurs qui sont souvent indispensables à l'action inhibitrice de ces molécules.

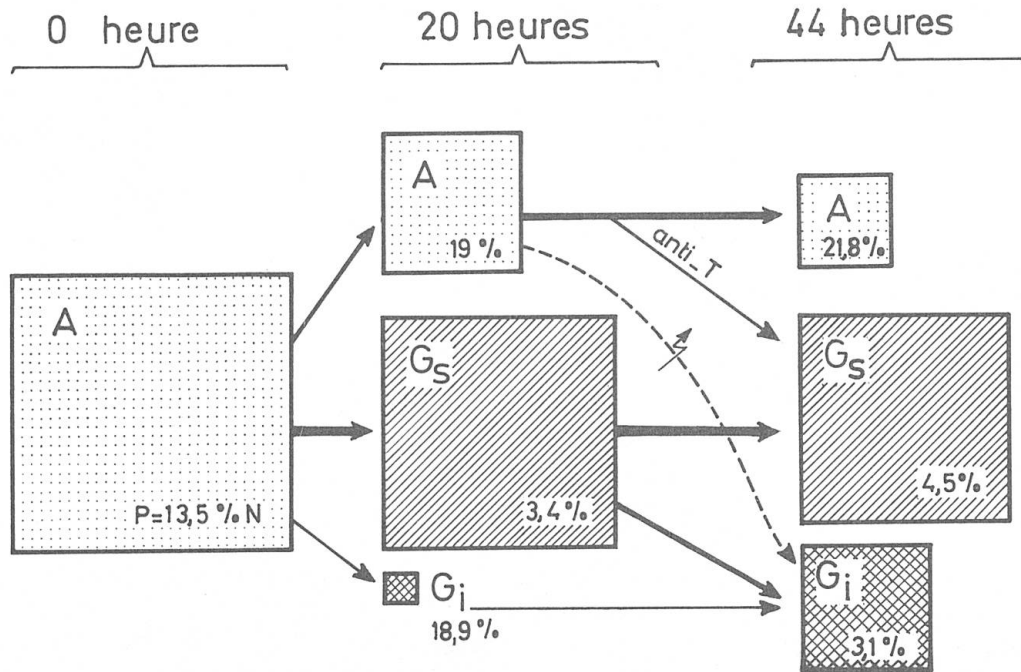


Fig. 9. – Modèle de la cinétique d'isolement des 3 familles protéiques au cours des 44 premières heures de dialyse. L'importance quantitative est rendue par la surface du carré figurant la famille; pour chaque famille un reflet de sa constitution est fourni par le rapport "azote/phosphore $\times 100$ " figuré à l'intérieur des carrés. Les flèches pleines indiquent la genèse probable d'une famille à partir d'une autre, interprétation qui rend le mieux compte du faisceau d'observations fourni par les analyses rapportées ici.

f) *Regroupement des données pour l'appréciation de la durée optimum de la dialyse*

La figure 9 offre un modèle des étapes d'isolement qui rend compte de l'évolution des caractères des protéines isolées. Les globulines insolubles, très faiblement représentées à 20 heures (fig. 4b et 9) ont une composition en phosphore relativement à la teneur en azote très voisine de celle des albumines restant en solution à 44 heures, elles pourraient être des albumines précipitées par dénaturation. Les globulines insolubles isolées abondamment entre 20 et 44 heures ont, en revanche, une proportion relative phosphore/azote beaucoup plus voisine de celle des globulines solubles, elles pourraient en provenir, ce qui rend compte de l'augmentation de l'activité inhibitrice spécifique des globulines solubles entre 20 et 44 heures. Le remaniement partiel des globulines solubles pendant cette période (arrivée de globulines encore en solution à 20 heures, départ de globulines isolées à 20 heures) paraît reflété dans l'évolution des diagrammes électrophorétiques (fig. 6).

3. Conclusions

Dans les conditions de dialyse rapide, 6 heures suffisent pour éliminer toutes les petites molécules; 20 heures permettent la précipitation du taux maximum de glo-

bulines dites "solubles" car elles se dissolvent à nouveau dans les solutions salines. Cependant les albumines contiennent encore une proportion importante de globulines qui, d'après leurs propriétés, semblent être des globulines solubles.

A 44 heures, les globulines sont plus complètement séparées des albumines mais au détriment de globulines instables. A 68 heures, globulines et albumines sont encore plus nettement séparées, les diagrammes électrophorétiques ont alors un aspect caractéristique pour chaque famille qui n'évolue plus, bien qu'au delà de 68 heures la durée de la dialyse devienne critique pour certaines activités biologiques; entre 68 et 164 heures, les albumines diminuent quantitativement mais aucune fraction électrophorétique ne disparaît, seules les proportions relatives de certaines fractions mineures se modifient, ce qui dénote tout de même une altération sélective; les molécules douées d'activité anti-trypsine font partie des molécules altérées; mais l'activité BAPA-asique des albumines est portée par des molécules stables résistant aux longues durées de dialyse, comme d'ailleurs les activités enzymatiques révélées en gel d'agarose.

Les globulines sont plus résistantes aux longues durées de dialyse, protégées peut-être par leur insolubilisation; leurs proportions et leur aptitude à la resublimation ne subissent que de très faibles variations entre 44 et 164 heures.

La comparaison des électrophorogrammes souligne comment une imprécision sur la qualité de la dialyse pourrait conduire à des interprétations erronées. La comparaison, par exemple, de protéines (albumines ou globulines) obtenues après 44 heures de dialyse avec leurs homologues obtenues également après 44 heures mais dans des conditions de rapidité moindre reviendrait, en fait, à comparer réellement les protéines qui, dans les conditions des figures 6, 8 ou 9, sont obtenues respectivement à 20 et 44 heures de dialyse. Or c'est dans cet intervalle que les diagrammes électrophorétiques comme les activités biologiques subissent les plus grandes variations.

En conclusion, 44 heures paraît la durée minimum de dialyse permettant de séparer les globulines des albumines malgré l'insolubilisation irréversible, entre 20 et 44 heures d'une partie des globulines. Ces globulines insolubles contiennent sans doute, à côté d'une petite quantité de globulines vraies dénaturées, de fausses globulines passées dans le surnageant de centrifugation sous forme de particules légères désagrégées ensuite au cours de la dialyse et sédimentant alors à partir de 44 heures. Une étude par centrifugation isopycniqne est en cours pour préciser ce point. A 44 heures, les dommages dûs à la dialyse semblent réduits au minimum. 68 heures pourraient représenter l'optimum pour les taxonomistes puisque les protéinogrammes généraux et les isoenzymogrammes qu'ils utilisent généralement prennent un aspect stable entre 44 et 68 heures et n'évoluent plus pour des durées supplémentaires. Cette durée permet, en outre, de se mettre en conditions d'échanges moins rapides par l'adoption de sacs à dialyse de diamètre plus élevé nécessités par les volumes relativement importants d'extraits.

Le choix de la durée de dialyse sera donc déterminé par le but poursuivi mais il importe de préciser tous les détails techniques susceptibles d'influencer la vitesse de dialyse et de toujours les reproduire rigoureusement pour obtenir des données répétitives et comparatives exigées aussi bien en taxonomie que pour l'étude des mécanismes ontogéniques de l'embryogénèse.

Matériel et détails expérimentaux

1. Provenance des graines, extractions et dosages

Des cotylédons de *Lablab purpureus* (L.) Sweet (= *Lablab niger* Medik.) variété D 58-21 sélectionnée par la Station de recherches agronomiques de Bambey au Sénégal, sont séparés des téguments et de l'axe germinatif. Les étapes d'extraction et d'analyse sont schématisées dans le tableau 1.

Les teneurs en phosphore sont évaluées sur les minéralisats Kjeldahl par la technique au phosphomolybdate de Delsal et Maunouri rapportée par BERTRAND (1963) modifiée comme suit pour supprimer les interférences de la teneur en acide sur la coloration. Réactifs: – solutions étalons de 5 à 30 μg de phosphore sous forme de PO_4HK_2 dans l'acide sulfurique 1.4 N (ayant subi le même traitement que les minéralisats); – blancs: acide sulfurique 1.4 N (même traitement); – hydroquinone 1%; – bisulfite de sodium 20%; – molybdate d'ammonium 5% dans l'acide sulfurique 5 N; les réactifs sont introduits dans l'ordre suivant: minéralisat, étalon ou blanc – eau – molybdate – bisulfite – hydroquinone dans les proportions respectives suivantes: 0.2-1.0-0.3-0.2-0.2 ml. Après exactement 30 minutes de développement la lecture est faite à 820 nm.

Les glucides sont appréciés par la méthode à l'orcinoïl selon STAUB (1963). La teneur en protéines est déterminée par la méthode de LOWRY & al. (1951).

2. Activités protéolytiques et anti-trypsine

Elles sont évaluées selon les méthodes exposées par ROYER & al. (1974) avec une différence portant sur la provenance de la trypsine (3.4.4.4.) ici de Fluka: trypsine puriss de pancréas de bœuf à activité $K > 10\ 000$ U (BAEE) mg.

3. Electrophorèses

Réalisées sur lames en gel d'agarose selon la technique de MASSEYEFF (1959) et en gel discontinu de polyacrylamide à pH 8.9 selon MAURER (1971) avec cette modification: le gel séparateur est à 7.5%, la migration a lieu sous tension de 2 mA par tube (5 x 75 mm) suivie de la fixation et de la coloration par une solution de noir amide à 1%, dans l'acide acétique 10% fréquemment renouvelé. Les isoenzymogrammes sont obtenus en plongeant, aussitôt après la migration, les lames d'agarose dans les mélanges réactionnels appropriés selon WIEME (1965).

Les résultats ont été confirmés par plusieurs répétitions à partir de l'extraction.

Remerciements

Nous remercions Monsieur Vallaeys, Directeur général de l'Institut de recherches agronomiques tropicales en France et Monsieur Tardieu, Directeur de la division de l'amélioration des plantes ainsi que Monsieur Beyle, Directeur adjoint du Centre de recherches agronomiques de Bambey au Sénégal, grâce auxquels nous recevons chaque année, dès la récolte, un lot de graines sélectionnées. Le contrôle ainsi assuré de la pureté génétique de notre matériel supprime un facteur capital de variance protéique. Nous remercions Madame Monique Stucker et Madame Andrea Rùchti pour leur collaboration technique.

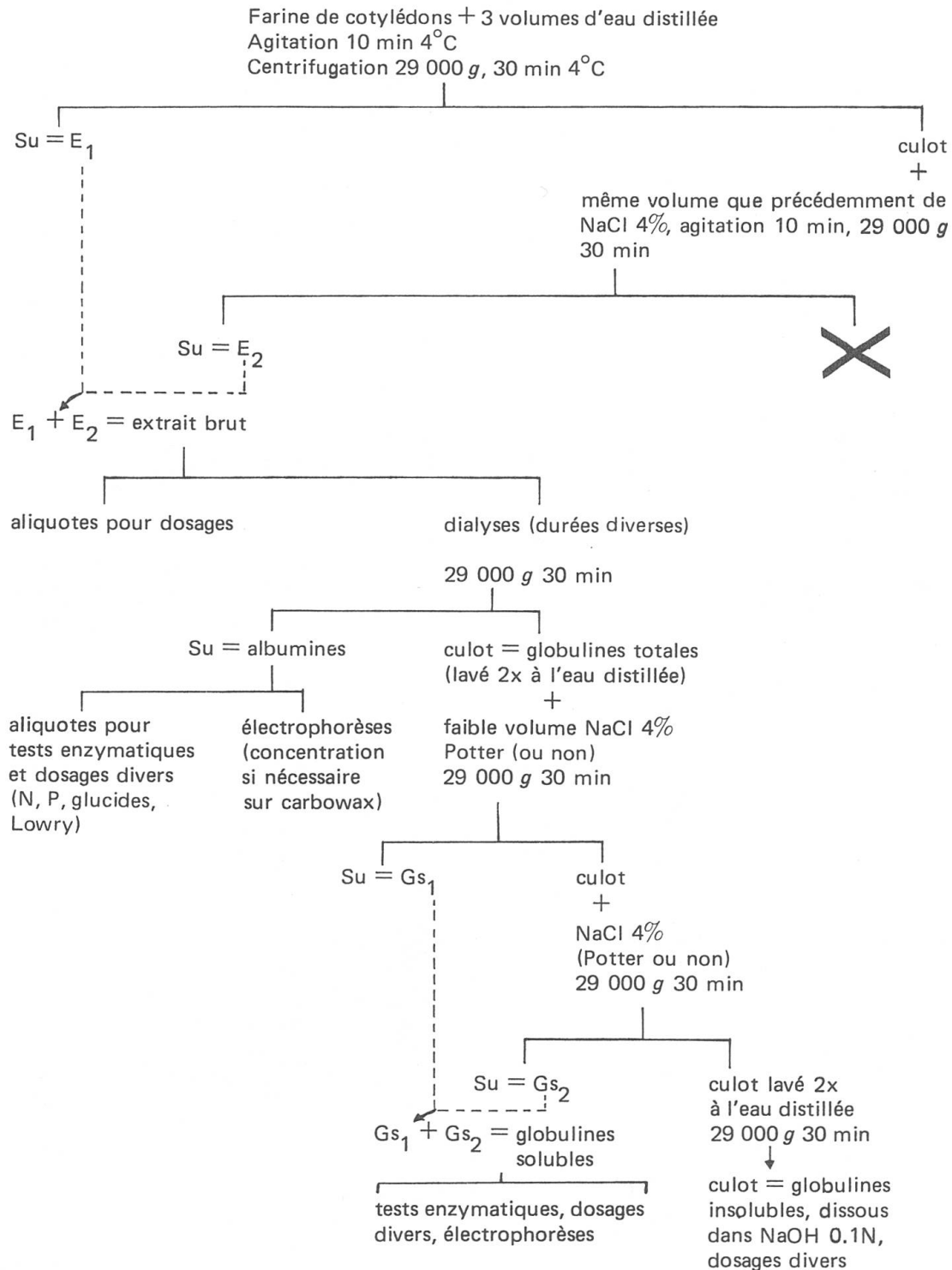


Tableau 1. — Schématisation des diverses étapes d'extraction, d'isolement et d'analyse des protéines salino-solubles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALTOSAAR, I., B. A. BOHM & R. ORNDUFF (1974). Disc electrophoresis of albumin and globulin fractions from dormant achenes of *Lasthenia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2: 67-72.
- BECKMAN, L., J. G. SCANDALIOS & J. L. BREWBAKER (1964). Catalase hybrid enzymes in maize. *Science* 146: 1174-1175.
- BERTRAND, D. (1963). Techniques de dosages. In J. Loiseleur (ed.), *Techniques de Laboratoires*: 983. Masson, Paris.
- ERDTMAN, H. (1971). La chimie vient au secours de la classification des espèces. *Rech.* 8: 31-40.
- HEYWOOD, V. H. (1973). Taxonomy in crisis? or Taxonomy is the digestive system of biology. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 19: 139-146.
- HOBDAY, S. M. & K. W. GILES (1973). Globulin storage proteins of *Glycine max.* *Phytochemistry*. 12: 2623-2626.
- JUO, P. S. & STOTZKY G. (1970). Changes in protein spectra of bean seed during germination. *Canad. J. Bot.* 48: 1347-1350.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR & R. J. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MASSEYEFF, R. (1959). Nouveau procédé de microélectrophorèse en gel de gélose. *Bull. Mém. Ecol. Nat. Méd. Dakar* 7: 248-252.
- MAURER, H. R. (1971). *Disc electrophoresis*: 44. Fischbeck, Berlin, New York.
- MIÈGE, J. (1975a) *Les protéines des graines*: 305. Conservatoire botanique & Georg, Genève.
- (1975b). Contribution à l'étude du genre *Adansonia*. III. Intérêt taxonomique de l'examen électrophorétique des protéines de graines. *Compt. Rend. VIII^e réunion plénière de l'AETFAT*. Genève 16-21 sept. 1974: 345-352.
- MIÈGE, M.-N. (1970). Etude des protéines des graines d'une Légumineuse: *Lablab niger* Medik. *Arch. Sci.* 23: 75-150.
- (1971). Valeur systématique des différences présentées par les protéines contenues dans les graines de plusieurs taxons de *Leucanthemum* (Composées, Astéracées). *Boissiera* 19: 269-287.
- & J. MIÈGE (1971). Les protéines de quatre espèces de *Dioscorea* d'Afrique occidentale. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 272: 2536-2539.
- MONOD, M., R. MARIE & P. FEILLET (1972). Fractionnement des protéines de quelques variétés de riz par électrophorèse en gel de polyacrylamide. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 274: 1957-1960.
- PUSZTAI, A. & W. B. WATT (1970). Glycoprotein II. The isolation and characterization of a major antigenic and non haemagglutinating glycoprotein from *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta* 207: 413-431.
- ROYER, A., M.-N. MIÈGE, A. GRANGE, J. MIÈGE & J.-M. MASCHERPA (1974). Inhibiteurs anti-trypsine et activités protéolytiques des albumines de graines de *Vigna unguiculata*. *Planta* 119: 1-16.
- SCANDALIOS, J. G. (1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochem. Genet.* 3: 37-79.
- SCHWARTZ, D. L. FUCHSMAN & K. H. MCGRATH (1965). Allelic isozymes of pH 7.5 esterase in maize. *Genetics* 52: 1265-1268.
- STAUB, A. M. (1963). Extraction, identification et dosage des glucides dans les extraits d'organes et les corps bactériens. In J. Loiseleur (éd.). *Techniques de Laboratoires*: 1343. Masson, Paris.

WIEME, R. J. (1965). *Agar gel electrophoresis*: 148. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London & New York.

WRIGHT, D. J. & D. BOULTER (1974). Purification and subunit structure of legumin of *Vicia faba* L. (broad bean). *Biochem. J.* 141: 413-418.

