

CARACTERISATION DES PROTEINES DE RESERVE DES GRAINES D'ARACHIDE (*Arachis hypogea* L.) ET DU NIEBE (*Vigna unguiculata* L. WALP.)

D. NWAGA¹, C. OMOLOKO², A. N FONFU³, E. KENGNI³, V. PK. TITANJI³

¹Centre de Biotechnologie de Nkolbisson et Département de Biologie et Physiologie végétales,
B.P. 812 Université de Yaoundé I, Cameroun. Email: dnwaga@uycdc.uninet.cm

²Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Département de Gastroentérologie
et de Nutrition, Université de Yaoundé I. email: omoloko@syfed.cm.refer.org

³Faculté des Sciences, Université de Buéa, Cameroun.

RESUME

La teneur en protéines des graines d'arachide et de niébé a été évaluée au laboratoire par électrophorèse basée sur les techniques de PAGE et SDS-PAGE. Une analyse comparée de la composition des protéines natives, albumines, globulines (légumineuses et vicilines) de réserve a été réalisée au moyen de l'électrophorèse PAGE et SDS-PAGE. Les résultats montrent que, comparé au niébé, le polymorphisme des albumines majeures de l'arachide est plus important, la moitié des sous-unités étant liée par des ponts disulfures. La majorité des globulines majeures de l'arachide est constituée de polypeptides liés entre eux par les ponts disulfures.

Mots clés : albumine, globuline, *Arachis hypogea*, *Vigna unguiculata*, légumineuse, Cameroun.

ABSTRACT

PROTEIN CONTENTS OF TWO GROUNDNUTS (*Arachis hypogea* L.) AND COWPEA (*Vigna unguiculata* L. WALP.)

Seed proteins content was evaluated in seeds from groundnut and cowpea (two leguminous food crops). A comparative study of protein composition of seeds has been carried on native proteins, albumins, globulins (legumins and vicilins) using PAGE and SDS - PAGE techniques. Compared with cowpea, the polymorphism of major albumins of groundnut was much more important : half of the sub-units were linked through disulfide bonds. The main groundnut globulins were constituted of polypeptides linked by disulfide bonds.

Keywords : albumin, globulin, *Arachis hypogea*, *Vigna unguiculata*, legume, Cameroon.

INTRODUCTION

Les protéines végétales consommées par habitant dans les pays en développement représentent environ 80 % des protéines totales, alors qu'ils ne

constituent que 50 % pour les pays développés (Calet, 1985). A cause de la richesse de leurs graines en protéines, les légumineuses représentent une part importante dans l'alimentation humaine et leur culture dans les pays moins développés constituent un des moyens pour y

augmenter la production de protéines alimentaires (Anonyme, 1979). L'arachide (*Arachis hypogea* L.) et le niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp.) sont des légumineuses alimentaires cultivées, dont les graines sont abondamment consommées dans les régions tropicales et subtropicales. Ces sources de protéines végétales sont moins chères et compensent une alimentation dominée par les sources de glucides telles que les céréales et les tubercules qui sont particulièrement pauvres en protéines (Westphal *et al.*, 1985). Les légumineuses sont également utiles pour l'agriculture et l'élevage car, elles peuvent fixer jusqu'à 100 - 400 kg d'azote/ha/an et fournir 40 à 200 kg d'azote/ha/an à la culture suivante (Wrigley, 1981 ; Dommergues *et al.*, 1985 ; Singh et Rachie, 1985; Rakipov, 1987; Hardarson, 1994). La teneur en protéines des graines d'arachide varie de 27 à 30 % alors que celle du niébé varie de 22 à 31 % selon les variétés et conditions environnantes (Westphal *et al.*, 1985 ; Rakipov, 1987; Paino d'Urzo *et al.*, 1990). Les protéines des graines de légumineuses ont été largement étudiées ces 20 dernières années à cause de leur importance économique et alimentaire (Guegen et Azanza, 1985). La plupart des études à ce jour ont principalement porté sur les légumineuses cultivées des pays tempérés comme le soja, le pois, le haricot ou le lupin, alors que celles des pays tropicaux comme l'arachide, le niébé ou le pois Bambara (*Vigna subterranea*) ont reçu une moindre d'attention, malgré leur importance dans les régions chaudes. Les protéines de réserve de l'arachide et du niébé sont constituées en majorité de globulines (60 - 90 % des protéines totales) et d'albumines (10 - 40 % des protéines totales). Alors que les globulines de l'arachide sont constituées d'une fraction légumine 13 S (arachine) et de viciline 7-8 S (conarachine). Celles du niébé sont en majorité

constituées de deux globulines majeures CP1 et CP2, représentées par une fraction viciline 7 S importante, et une petite fraction légumine 11 S (Derbyshire *et al.*, 1976; Khan *et al.*, 1980). Les albumines de l'arachide peuvent représenter jusqu'à 20 % des protéines totales pour 60 - 75 % de globulines (Larkins, 1981). Les albumines des légumineuses sont d'importants indicateurs de la qualité nutritionnelle à cause de leur teneur élevée en méthionine comparées aux globulines. Pour les globulines, les légumineuses ont un meilleur contenu en acides aminés soufrés, comparés aux vicilines (Anonyme 2, 1972 ; Larkins, 1981). Le facteur nutritionnel limitant des graines de légumineuses est la déficience en acides aminés soufrés tels que la méthionine et la cystéine (Roca *et al.*, 1990).

Ce travail a pour objectif principal la comparaison des protéines de réserve majeures en l'arachide et du niébé après fractionnement en albumines et globulines (léguminees et vicilines). Ceci, pour analyser la variabilité génétique, étape essentielle dans la caractérisation des nombreuses variétés locales ou introduites, et aider les sélectionneurs à améliorer les légumineuses à graines.

MATERIELS ET METHODES

CHOIX DU MATERIEL VEGETAL

Les graines utilisées proviennent de deux variétés locales d'arachide A26 et A32, abondamment cultivées dans le Centre et l'Est du Cameroun, à l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD). Quant au niébé, les graines proviennent de deux variétés améliorées IT 81 D 985 et IT 87 D 1676 de l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA) basé à Ibadan (Nigéria).

DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU ET EN MATIERES GRASSES

La teneur en eau a été évaluée par estimation de la différence de poids avant et après séchage des graines à l'étuve pendant 48 h, à 80 °C. Après broyage des graines et dégraissage de la farine à l'aide de l'acétone froide (-20 °C), la différence de poids entre la farine dégraissée et séchée et la farine entière sèche a permis de calculer la teneur approximative en matières grasses. Après dépéliculage, les graines congelées ont été broyées dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une farine fine. La farine a été suspendue dans de l'acétone froide (-20 °C) à raison de 1 g/10 ml, puis homogénéisée au réfrigérateur sous agitation magnétique pendant une heure. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 17.000 g pendant 30 min, à 4 °C. L'extraction des matières grasses a été répétée trois fois sur le culot après élimination du surnageant. Le culot a ensuite été séché sous vide pendant au moins 2 h dans le but d'obtenir de la farine dégraissée.

EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES PROTÉINES TOTALES

Les protéines totales non-dénaturées ont été obtenues par extraction à 4 °C dans un tampon contenant 25 mM de Tris - HCl, pH 6,9, à 1 % de triton X 100 et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF). Les fractions albumines et globulines ont été obtenues selon la méthode modifiée de Lichtenfeld *et al.* (1979). L'extraction des albumines a été faite pendant 1 h par agitation dans un tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 constitué de 10 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO), 0,5 % de n-butanol, 0,01 % de 2-mercaptoéthanol 0,1 M d'acide acétique, 0,1 M d'acétate de sodium et 1 mM de PMSF à raison de 100 mg de poudre par ml de tampon. Trois extractions successives ont été réalisées

sur le culot et le surnageant collecté après centrifugation à 170.000g pendant 30 min à 4 °C a été précipité à l'aide de l'acétone froide (extrait:acétone, 1:8 v/v) et séché sous vide pendant au moins 2 h.

La fraction des globulines a été obtenue à partir du culot post-albuminique suspendu dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 constitué de 1,5 M de NaCl pendant 1 h par agitation à 4 °C, puis centrifugé à 17.000 g pendant 30 min à 4 °C. Trois extractions successives ont été réalisées et le surnageant collecté a été précipité à l'aide de l'acétone froide (-20 °C) et séché sous-vide au moins 2 h. Afin de fractionner les globulines en légumine et vicilines, une partie de l'extrait globuline a été dialysée dans un sac millipore de dialyse dont la taille de coupure est de 6000 à 8000 daltons dans 0,1 M de tampon Mc Ilvaine, pH 4,8 pendant 12 h à 4 °C, puis centrifugé à 17.000 g pendant 30 min à 4 °C. Le culot lavé 3 fois à l'aide de l'acétone froide (-20 °C) et séché, constitue la fraction légumine. Le surnageant a été dialysé dans l'eau distillée pendant 24 à 48 h à 4 °C, puis centrifugé à 17.000 g pendant 30 min à 4 °C. Le culot, lavé 3 fois avec l'acétone froide (-20 °C) a été séché pour constituer la fraction viciline. Tous les extraits ont été lyophilisés et conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation. Les extraits lyophilisés ont été solubilisés de deux manières :

1) En conditions natives (polyacrylamide gel electrophoresis ; PAGE) la fraction a été solubilisée dans un tampon Tris -HCl 62 mM, pH 6,8 contenant 10 % de glycérol et 0,02 % de bleu de bromophénol à 4 °C.

2) En conditions dénaturantes (SDS-PAGE) deux traitements différents ont été effectués. Une fraction a été suspendue dans le tampon Tris précédent auquel on a ajouté SDS à 2,3 %, ce qui a constitué les conditions non-réductrices (sans mercaptoéthanol, -ME). Une autre fraction a été suspendue dans le tampon Tris auquel le SDS à 2,3 % et du

2-mercaptol éthanol à 5 % ont été ajoutés, ce qui a constitué les conditions réductrices (avec mercaptoéthanol, +ME). Ces deux extraits ont ensuite été dénaturés pendant 3 min dans un bain-marie à 100 °C.

DOSAGE DES PROTEINES SOLUBLES

Les fractions d'albumines et de globulines en suspension ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976) alors que les protéines totales des graines déshuilées l'ont été par la méthode de Kjeldahl après minéralisation distillation et titration de la farine sèche (Anderson et Ingram, 1993).

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE (PAGE ET SDS - PAGE)

Les protéines totales non dénaturées ont été séparées dans un gel à 7,5 % (PAGE) tandis que les protéines dénaturées (-ME et +ME) ont été séparées dans un gel à gradient de 10 - 15 % d'acrylamide (SDS - PAGE). La concentration du gel supérieur a été de 4 % d'acrylamide et les procédures utilisées pour la préparation des différents gels ont été celles de Hames et Rickwood (1985). La migration électrophorétique a été réalisée en gel plan de 1,5 mm à l'aide d'un appareil vertical de marque Biorad selon le système discontinu décrit par Ornstein (1964) et la méthode de Laemmli (1970). Chaque puits a reçu 20 à 40 µg de protéines, la migration a été effectuée à courant constant (10 mA/gel) pendant 12 à 16 h à faible voltage (50 - 150) volts et à température ambiante pour les protéines dénaturées et à 4 °C pour les protéines natives.

Après la migration électrophorétique, les protéines ont été fixées dans de l'acide trichloracétique à 10 % pendant

2 h. Ensuite, elles ont été révélées soit par coloration au bleu de coomassie R 250 à 0,05 % dissout dans le fixateur, soit par le nitrate d'argent selon la méthode décrite par Damerval *et al.* (1987). Les glycoprotéines ont été révélées par la méthode de Segrest et Jackson (1972). L'évaluation des poids moléculaires des protéines a été réalisée par comparaison avec ceux des protéines de référence Biorad.

ANALYSE DES PROFILS

Pour chaque profil, le Rf de chaque bande et de chaque polypeptide a été calculé puis le poids moléculaire (PM) a été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage constitué de marqueurs de poids moléculaire compris entre 14 et 94 kD. La composition des sous-unités de chaque fraction protéique a été établie afin d'effectuer une comparaison des profils entre les diverses variétés d'une même espèce ou entre les deux légumineuses.

RESULTATS

CARACTERISTIQUES DES VARIETES D'ARACHIDE ET DE NIEBE UTILISEES

Les deux variétés d'arachides A26 et A32 utilisées ont une teneur en matières grasses respective de 27 et 49,5 % du poids sec, alors que celle du niébé est de 6 et 1 % pour les variétés 1T81D-985 et 1T87D-1676 (tableau 1). La teneur en protéines (Kjeldahl) des deux variétés d'arachide est plus élevée que celle des deux variétés de niébé, 29-32 % pour l'arachide contre 24-29 % pour le niébé. La teneur en eau du niébé est à peu près le double de celle de l'arachide (tableau 1).

Tableau 1 : Composition en eau, matières grasses et protéines des variétés d'arachide (*Arachis hypogea*) et du niébé (*Vigna unguiculata*).

Water, fat and protein content of varieties of groundnut (*Arachis hypogea*) and cowpea (*Vigna unguiculata*).

Légumineuses	Variétés	Teneur (%)		
		Eau	Matières grasses	Protéines
<i>Arachis hypogea</i>	A26	5,5	27,0	29,21 ± 0,36
	A32	6,0	49,50	32,46 ± 0,77
<i>Vigna unguiculata</i>	81D	9,5	6,0	24,34 ± 1,01
	87D	10,0	1,0	29,21 ± 1,01

(% de la matière sèche sauf pour l'eau)

PROTEINES TOTALES NATIVES

L'électrophorèse des protéines totales analysées en système PAGE montre, pour les deux variétés d'arachide, la présence de 4 bandes protéiques dont une majeure de Rf 0,38 - 0,44 est particulièrement abondante (figure 1). Les deux variétés d'arachide présentent une variabilité au niveau de deux bandes mineures. Les protéines totales du niébé analysées en conditions natives montrent la présence de 5 bandes protéiques dont deux majeures de Rf 0,35 et 0,40, la dernière étant plus abondante. La comparaison entre les deux variétés de niébé montre qu'elles peuvent être différenciées par deux protéines mineures (figure 1). Les protéines majeures de l'arachide et celles du niébé sont des glycoprotéines qui ont une mobilité électrophorétique voisine dont le Rf est compris entre 0,40 et 0,42.

ALBUMINES DES GRAINES

Les albumines des graines d'arachide analysées en conditions dénaturantes et non réductrices (SDS - PAGE, - ME) montrent qu'elles sont constituées de 6 polypeptides majeurs de PM 65, 58, 50, 17, 15,5 et 14 kD, ainsi que d'un polypep-

tide de 60 kD, spécifique à la variété A32, pour laquelle les deux polypeptides de 58 et 50 kD sont absentes (figure 2). Les albumines des graines de niébé sont constituées de 4 polypeptides majeurs de 94, 58, 50 et 31 kD, ainsi que de plusieurs polypeptides moyens comme ceux de 62, 33, 30 et 27 kD. La comparaison entre les albumines majeures des graines d'arachide et celles du niébé fait ressortir des similitudes au niveau de deux polypeptides majeurs de 58 et 50 kD (figure 2). Par ailleurs, chez l'arachide les sous-unités de 15,5 et 14 kD, ainsi que celle de 62 kD (variété A32) sont reliées par les ponts disulfures, alors que les albumines des graines de niébé n'ont pas de sous-unités liées par des ponts disulfures.

GLOBULINES DES GRAINES

Les globulines des graines d'arachide sont composées de 7 polypeptides majeurs de 67, 64, 59, 43, 41, 37 et 23 kD, mal révélées par la coloration au nitrate d'argent. Les polypeptides majeurs de 64 et 59 kD sont constitués de monomères reliés par des ponts disulfures car ils disparaissent sur les profils en conditions réductrices (figure 3). Les globulines majeures des graines de niébé sont constituées de 3 polypeptides majeurs de 64, 58 et 50

kD. Les bandes mineures de 94 et 87 kD spécifiques de la variété IT81D 985 sont les seules liées par des ponts disulfures. La comparaison entre les globulines majeures de l'arachide et celles du niébé fait ressortir la présence d'une sous-unité majeure de 64 kD commune aux deux légumineuses, mais celles de l'arachide sont constituées de plusieurs polypeptides liés par des ponts disulfures. Par ailleurs les albumines majeures du niébé sont en majorité constituées de protéines sans ponts disulfures contrairement à celles de l'arachide où on retrouve deux sous-unités.

LEGUMINES ET VICILINES DES GRAINES

Les légumineuses des graines de l'arachide sont constituées de 3 polypeptides de 67, 64 et 59 kD qui sont tous composés de monomères liés par des ponts disulfures et de PM 41, 36, 34 et 23 kD (figure 4). Pour le niébé, les 4 polypepti-

des légumineuses possèdent des PM de 69, 59, 54 et 49 kD et 2 polypeptides mineurs de 94 et 67 kD. Seul le polypeptide majeur de 69 kD du niébé est constitué de monomères liés par des ponts disulfures, l'un des composants a 20 kD. Les légumineuses majeures de 67 et 59 kD semblent communes aux graines d'arachide et de niébé. Alors que l'arachide possède tous ses 8 polypeptides des légumineuses majeurs liés par les ponts disulfures, le niébé a 1 seul polypeptide sur les 4. Les vicilines des graines d'arachide sont constituées de 6 polypeptides majeures de PM 67, 64, 59, 19, 17, et 14 kD. Cinq d'entre eux sont composés de monomères liés par des ponts disulfures de PM 44, 42, 37, et 22 kD, respectivement (figure 5).

Les trois vicilines majeures du niébé sont des polypeptides de 62, 56 et 52 kD sans monomères liés par des ponts disulfures. Sur la base des PM, les vicilines majeures de l'arachide comparées à celles du niébé, semblent complètement différentes.

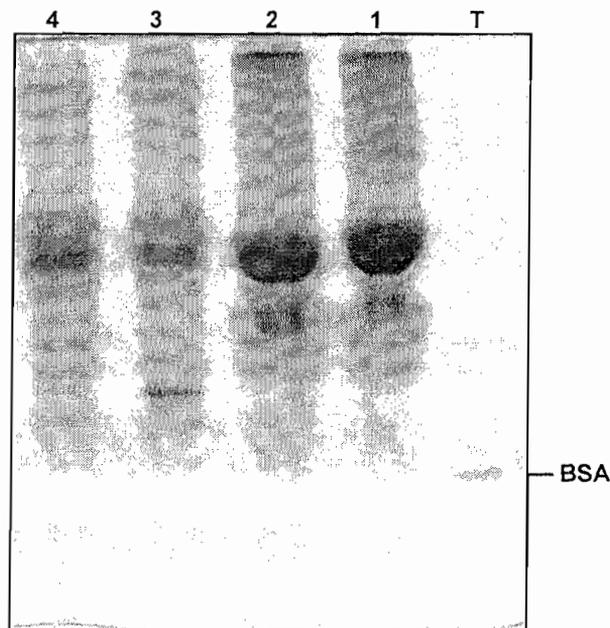


Figure 1 : Profils des protéines natives totales de *Arachis hypogea* analysées par le système PAGE. [variété A26 (1) et A32 (2)] et de *Vigna unguiculata* (variété 81D (3) et 87D (4)).

Total native protein profiles of Arachis hypogea analyzed by the PAGE system. [varieties A26 (1) and A32 (2)] and Vigna unguiculata (varieties 81D (3) and 87D (4)).

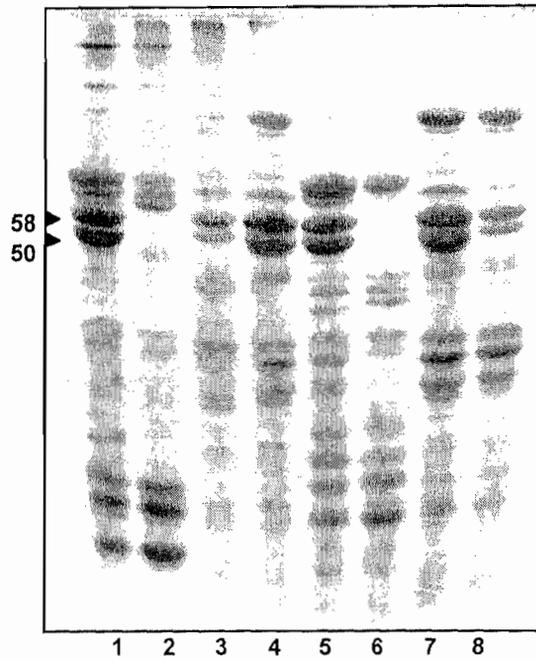


Figure 2 : Profils des albumines de *Arachis hypogea* analysées par le système SDS - PAGE. (variétés A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) et *Vigna unguiculata* (variétés 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) - ME : sans mercaptoéthanol, + ME avec mercaptoéthanol.

Albumin profiles of Arachis hypogea analyzed SDS – PAGE system.

(varieties A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) and *Vigna unguiculata* (varieties 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) - ME : without mercaptoethanol, + ME with mercaptoethanol.

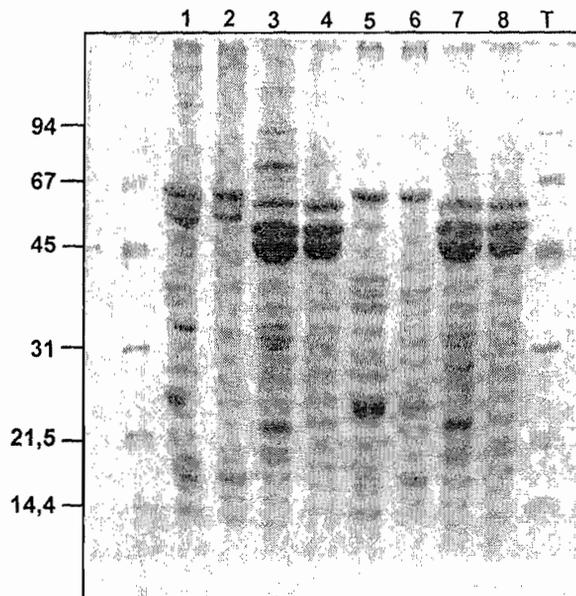


Figure 3 : Profils de globulines de *Arachis hypogea* analysées par le système SDS - PAGE.

(variétés A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) et *Vigna unguiculata* (variétés 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) . - ME : sans mercaptoéthanol + ME : avec mercaptoéthanol.

T: marqueurs de poids moléculaires.

Globulin profiles of Arachis hypogea analyzed by SDS – PAGE system.

(varieties A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) and *Vigna unguiculata* (varieties 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) . - ME : without mercaptoethanol + ME : with mercaptoethanol. T: molecular weight markers.

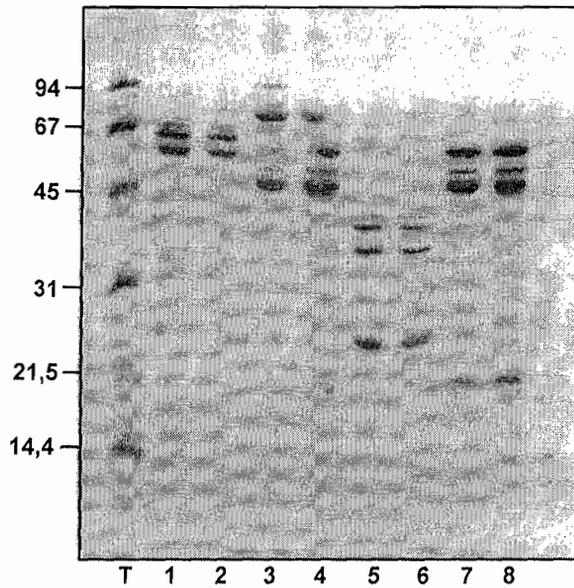


Figure 4: Profils des légumine de *Arachis hypogea* analysées par le système SDS - PAGE. (variété A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5) ; A32 (6) : + ME) et *Vigna unguiculata* (variétés 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) : - ME : sans mercaptoéthanol ; + ME avec mercaptoéthanol. T: marqueurs de poids moléculaires.

Legumin profiles of Arachis hypogea analyzed by SDS - PAGE system.

(varieties A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) and *Vigna unguiculata* (varieties 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) - ME : without mercaptoethanol + ME : with mercaptoethanol. T: molecular weight markers.

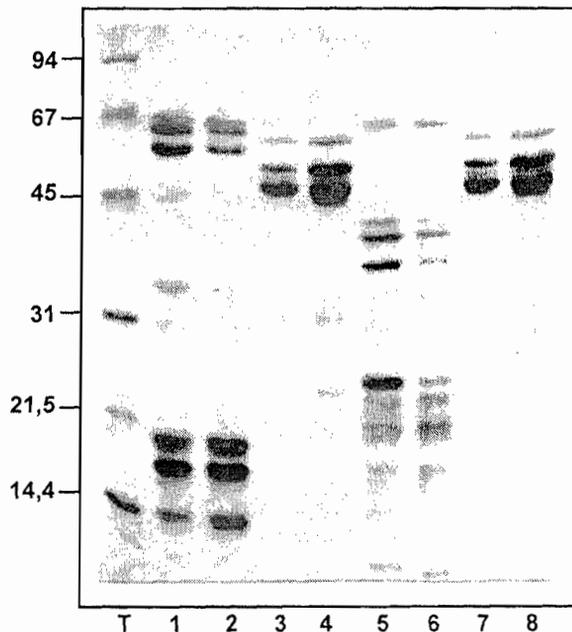


Figure 5 : Profils des vicilines de *Arachis hypogea* analysées par le système SDS - PAGE (variétés A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) et *Vigna unguiculata* (variétés 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) : - ME : sans mercaptoéthanol + ME : avec mercaptoéthanol. T: marqueurs de poids moléculaires.

Vicilin profiles of Arachis hypogea analyzed by SDS - PAGE system.

(varieties A26 (1), A32 (2) : - ME ; A26 (5), A32 (6) : + ME) and *Vigna unguiculata* (varieties 81D (3), 87D (4) : - ME ; 81D (7), 87D (8) : + ME) - ME : without mercaptoethanol + ME : with mercaptoethanol. T: molecular weight markers.

DISCUSSION

Les teneurs en eau, huile et protéines des graines d'arachide et du niébé obtenues sont comparables à celles trouvées par plusieurs autres auteurs (Westphal *et al.*, 1985; Rakipov, 1987; Pasquet *et al.*, 1987).

L'arachide possède généralement une teneur plus élevée en protéines même si la variété locale d'arachide A26 possède une teneur comparable à celle de la variété améliorée de niébé IT 87D1676 avec 29 %. Par ailleurs, la variété locale d'arachide A26 est vulgarisée par l'IRAD dans les provinces du Centre et de l'Est du Cameroun. Les protéines totales natives des graines d'arachide et de niébé sont constituées d'une globuline majeure glycosylée, dont la concentration est plus élevée chez l'arachide (Nwaga *et al.*, non publiés). Pour le niébé, les deux protéines majeures correspondent à celles décrites par Khan *et al.* (1980) et identifiées par Pedalino *et al.* (1990) comme étant CP1 et CP2. Elles constituent les globulines majeures de *Vigna unguiculata*. Les albumines majeures des deux variétés d'arachide étudiées diffèrent considérablement par l'absence de deux polypeptides majeurs de 58 et 50 kD chez la variété A32. Par ailleurs, la teneur en huile de cette variété est nettement supérieure à celle de la variété A26 (49,5 % contre 27 % respectivement (tableau 1). Il importe de savoir s'il existe un lien entre l'absence de ces polypeptides et la teneur élevée en lipides. De plus, le criblage d'un nombre plus important de variétés à teneur variable en huile est nécessaire pour avoir une idée plus précise, car la mise en évidence d'une relation entre un caractère quantitatif et un marqueur génétique est particulièrement intéressante pour la sélection variétale.

Les deux variétés améliorées de niébé présentent des profils en albumines majeures semblables, même si la variété IT 87D 1676 possède un polypeptide mineur de 49 kD supplémentaire. De plus,

ces polypeptides de 58 et 50 kD sont quantitativement plus importants. Cette variété possède par ailleurs une teneur 6 fois plus basse en matières grasses. Comparées aux albumines de l'arachide, celles du niébé sont plus stables en présence d'agents réducteurs. Chez la féverole, Pasqualini *et al.* (1991) ont noté une importante variabilité de la teneur en albumine chez plusieurs variétés comme dans le cas des deux légumineuses utilisées dans cette étude. Les résultats de Pedalino *et al.* (1990) obtenus sur *Vigna unguiculata* identifient comme albumines majeures 3 bandes de 95, 63 et 32 kD, tandis que notre étude les identifie comme mineures. Fotso *et al.* (1994) trouvent les bandes d'albumines majeures de 94, 86, 32 et 24 kD. La présente étude montre des albumines majeures de 94, 58, 50 et 31 kD, ainsi que des polypeptides moyens de 62,33 et 27 kD et mineurs de 87 kD. On retrouve donc la bande majeure de 86 kD décrite par Fotso *et al.* (1994) comme étant mineure avec 87 kD pour les deux variétés étudiées. Ces divergences sont probablement dues aux différentes procédures, tampons et variétés utilisées dans les différentes études. Alors que les albumines de *Vigna unguiculata* semblent monomorphes, celles de *Arachis hypogea* semblent polymorphes. Cette diversité chez *Arachis hypogea* pourrait être utilisée comme marqueur pour la sélection des variétés destinées à la consommation ou à l'huilerie.

La comparaison entre les deux variétés du niébé montre que le profil des globulines de la variété IT 81D 985 correspond au profil de type A décrit par Pedalino *et al.* (1990) confirmé par Fotso *et al.* (1994). Celui de la variété IT 87D 1676 par contre correspond au profil de type B (présence d'un polypeptide de 54 kD). Toutes les trois sous-unités légumineuses des graines de l'arachide sont reliées par des ponts disulfures, alors que 1 seule sur les 4 l'est chez le niébé. L'analyse de la constitution des vicilines montre que la majorité des sous-unités (5/6) chez

l'arachide possèdent des ponts disulfures tandis qu'aucune sous-unités sur les trois chez le niébé n'en possède. Les globulines de l'arachide, comparées à celles du niébé, selon le poids moléculaire, montrent une composition différente. Les graines de *Arachis hypogea* possèdent une globuline native majeure tandis que celles de *Vigna unguiculata* contiennent deux globulines natives majeures CP1 et CP2.

Tout comme chez les autres légumineuses étudiées jusqu'à présent, les albumines et les globulines constituent les deux catégories de protéines de réserve des graines d'arachide (*Arachis hypogea* L. et celles du niébé (*Vigna unguiculata* L. Walp) (Danielsson, 1949). Les globulines natives de *Arachis hypogea* sont beaucoup plus complexes et plus riches en soufre que celles de *Vigna unguiculata*, du fait de l'existence d'un nombre élevé de ponts disulfures (8 sous-unités majeures sur les 9 légumineuses et vicilines pour l'arachide contre une sous-unité majeure sur les 7 pour le niébé).

On peut comparer les légumineuses et les vicilines majeures de *Arachis hypogea* à celles de *Pisum sativum*. Selon Larkins (1981), la dissociation par le SDS faite sur *Pisum sativum* révèle l'existence des protéines d'environ 65 kD comprenant des sous-unités de 20 et 40 kD reliées par des ponts disulfures. Les résultats de cette étude montrent que dans les conditions non réductrices (SDS, -ME) les légumineuses majeures ont un poids moléculaire compris entre 60 et 70 kD chez l'arachide, et 50 et 70 kD chez le niébé. Les protéines des graines d'arachide sont constituées de polypeptides de 23 à 41 kD et celles du niébé 20 kD.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent clairement qu'il y a des similitudes entre les albumines majeures de l'arachide et celles du niébé en ce qui concerne les polypeptides de 50 et 58 kD.

Par contre, du point de vue des globulines, les deux légumineuses étudiées diffèrent de manière significative, car chez l'arachide on note plus de ponts disulfures. Nos résultats montrent l'intérêt pour la recherche de critères biochimiques permettant de caractériser des variétés d'intérêt agronomique comme le recommandent Cooke (1984) et Autran (1986).

Ces résultats, montrent que l'analyse de ces protéines de réserve est assez complexe à partir de l'électrophorèse mono dimensionnelle seule. Une analyse plus approfondie des globulines serait nécessaire après isolement des composés protéiques, le fractionnement par chromatographie, puis la caractérisation de la masse, la composition en sous-unités, et la détermination du point isoélectrique par les méthodes d'électrophorèse bidirectionnelle et de focalisation isoélectrique comme il a été démontré pour le genre *Lupinus* (Citharel et Delamarre, 1989; Esnault *et al.*, 1991; Esnault *et al.*, 1993). Dans le contexte tropical africain, ces résultats constituent une étape importante vers l'amélioration de la qualité des légumineuses à graines par les biotechnologies.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. Essomba B.N., responsable du programme d'amélioration des légumineuses et chef du "Centre de la Recherche Agricole pour le Développement" (IRAD) au Cameroun, pour l'approvisionnement en graines. Nous remercions également Mme Marie-Andrée Esnault, Maître de Conférences au Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Rennes I, pour la critique de ce travail.

REFERENCES

- ANONYME 1, 1972. Nuclear techniques for seed protein improvement. Proceedings of a research coordination meeting. June 1972. IAEA Vienne, STI/PUB/320 231.
- ANONYME, 1979. Tropical legumes : ressources for the future. National Academy of Sciences, Washington D C 1979, 307 p.
- ANDERSON (J. M.) and (J. S. I.) INGRAM. 1993. Tropical soil biology and fertility : a handbook of methods. 2nd ed Commonworld Agricultural Bureau, Wallingford, G B,
- AUTRAN (J. C.), 1986. Identification des céréales et autres plantes par électrophorèse. Biofutur, 51: 121-126.
- BRADFORD (M. M.), 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254.
- CALET (C.), 1985. L'innovation au service de l'approvisionnement en protéines des hommes et des animaux domestiques. In (B.) Godon (Ed) Protéines végétales. Lavoisier Tec et Doc, 1-24.
- CITHAREL (J.) et (D.) DELAMARRE. 1989. Synthesis of conglutin during seed maturation in *Lupinus albus*. Plant Physiol Biochem, 27: 211-218.
- COOKE (R.J.), 1984. Review : the characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. Electrophoresis, 5: 59-72.
- DAMERVAL (C.), (M.) ZIVY, (F.) GRANIER, (N.) BAHRMAN, (C.) COLAS DES FRANCS, (T.) BLAISONNEAU, (M.P.) DIGARD, (M.) LE GUILLOUX, (H.) THIELLEMENT, (D.) DE VIENNE. 1987. Amélioration de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle des protéines pour les études de génétique végétale. Revue de l'Institut Pasteur de Lyon, 20 (1-2): 59-63.
- DANIELSSON (C. E.), 1949. Seed globulins of the gramineae and leguminosae. Biochem J; 44: 387 - 400.
- DERBYSHIRE (E.), (D. J.) WRIGHT, (D.) BOULTER. 1976. Review : legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry; 15: 3- 4.
- DOMMERGUES (Y.), (B) DREFUS, (D.)HOANG GIA, (E.) DUHOUX. 1985. Fixation de l'azote et agriculture tropicale. La Recherche; 162: 22-31.
- ESNAULT (M. A.), (A.) MERCEUR, (J.) CITHAREL. 1993. Biosynthèse des protéines et formation des corps protéiques dans la graine de lupin jaune (*Lupinus luteus* L., Légumineuses) Agronomie; 13: 307-316.
- ESNAULT (M. A.), (A.) MERCEUR, (J.) CITHAREL. 1991. Characterization of yellow lupin seeds. Plant Physiol Biochem, 29: 573-583.
- FOTSO (M.), (J. L.) AZANZA, (R.) PASQUET, (J.) RAYMOND. 1994. Molecular heterogeneity of cowpea (*Vigna unguiculata*, Fabaceae) seed storage proteins. Plant Syst Evol, 191: 39 - 56.
- GUEGEN (J.) et (J. L.) AZANZA. 1985. Composition et propriétés physico-chimiques des protéines de légumineuses et d'oléagineux. In (B.) Godon (Ed.). Protéines végétales. Lavoisier Tec et Doc, 135-160.
- HAMES (B D) and (D.) RICKWOOD. 1985. Gel electrophoresis of protein. A practical approach. Ed IRL Press, 290 p
- HARDARSON (G), 1994. International FAO/IAEA programmes on biological nitrogen fixation. In (P.H.) Graham, (M. J.) Sadownsky et (C. P.) Vance (Ed.). Symbiotic nitrogen fixation.. Kluwer Acad Publ, 189-202.
- KHAN (M. R. I.), (J. A.) JACOBSEN, (D) BOULTER. 1980. The seed proteins of cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.). J Experim Bot ; 31: 1599-1611.
- LAEMMLI (U. K.), 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature; 227: 681-685.
- LARKINS (B. A.) 1981. Seed storage proteins : characterization and biosynthesis. In The biochemistry of plants. Ed Academic Press, 449 - 489.
- LICHTENFELD (C.), (R.) MANTEUFFEL, (K.) MUNTZ, (D.) NEUMANN, (G.) SCHOLZG, (E.) WEBER. 1979. Protein degradation and proteolytic activities in germinating field beans (*Vicia faba* L. var minor). Biochem Physiol Pflang; 174: 255-274.
- ORNSTEIN (L.). 1964. Disc electrophoresis : I background and theory. Annals New York Acad. Sci, 121 : 321-349.
- PAINO D'URZO (M.), (M.) PEDALINO, (S.) GRILLO, (R.) RAO, (M.) TUCCI. 1990. Variability in major seed proteins in different *Vigna* species. In (N.) NG, (L. M.) MONTI (Ed.). Cowpea genetic resources. IITA, Ibadan, 90-100.
- PASQUALINI (S.), (C.) LLUCH, (M.) ANTONIELLI. 1991. Seed storage proteins in several genetic lines of *Vicia faba*. Plant Physiol Biochem; 29: 505-515.

- PASQUET (T. R.), (M.) FOTSO, (L.) NOUBI, (S.) TRECHE. 1987. Comparaison de la valeur nutritionnelle de quelques légumineuses locales à celles des légumineuses introduites ou en voie d'introduction au Cameroun. *Revue Sciences et Techniques (Sc. Santé)*; IV (3 et 4) 41-53.
- PEDALINO (M.), (M.) PAINO D'URZO, (A.) COSTA, (S.) GRILLO, (R.) RAO. 1990. Biochemical characterization of cowpea seed proteins. In: (N.) NG, (L. M.) MONTI (Ed.) *Cowpea genetic resources*, IITA, Ibadan, 81-89.
- RAKIPOV (N.), 1987. Légumineuses à graines. In: Mir (Ed.) *Biochimie des cultures tropicales Moscou*, 224 – 247.
- ROCA (W. M.), (L. C.) MUNOZ, (P.) CHAVARRIAGA et (H.) RAMIREZ. 1990. The potential role of biotechnology in the improvement of *Phaseolus* beans. In: CTA & FAO (Ed.). *Plant biotechnologies for developing countries*, 295-299.
- SEGREST (J. P.) et (R. L.) JACKSON. 1972. Molecular weight determination of glycoprotein by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Meth. in Enzymol*; 28 : 54-63.
- SINGH (S. R.) and (O.) RACHIE K. 1985. Cowpea research, production and utilization. John Wiley and Sons Ltd.
- WESTPHAL (E.), (J.) EMBRETTTS, (J. D.) FERWERDA, (H.A.E.) VAN GILS MEENS, (H.J.W.) MUTSAERS, (J.M.C.) WESTPHAL-STEVELS. 1985. Cultures vivrières tropicales avec référence spéciale au Cameroun, Pudoc Wageningen , 300 p.
- WRIGLEY (G.). 1981. Tropical agriculture. The development of production; 4th Ed. ELBS/ Longman, 109-132.