

ACTIVITES PROTEOLYTIQUES ET ANTI-TRYPSINE DES GRAINES DE *VIGNA UNGUICULATA*: REPARTITION ET INTERACTION

ANNICK ROYER

Institut de botanique systématique de l'Université de Genève, Laboratoire de chimie taxonomique,
1, chemin de l'Impératrice, CH-1292, Chambésy Suisse

(Reçu le 20 août 1974)

Key Word Index—*Vigna unguiculata*; Légumineuses; albumines et globulines des graines; activité protéolytique; inhibiteurs anti-trypsin; interaction des activités anti-trypsin/endoprotéasiques.

Abstract—Data are given on distribution of caseolytic, BAPA-asic and anti-trypsin activities in albumins and globulins from embryos and cotyledons of *Vigna* seeds. Embryos are found to be richer in proteolytic enzymes than cotyledons. Trapping of anti-trypsin inhibitors solely enhances the albumin's caseolytic activities. Globulins do not show any BAPA-asic activity. The globulinic anti-trypsin inhibitors are similar on polyacrylamid gels (four fractions) whether the cotyledons or axes are used. The albuminic ones show one fraction more.

Résumé—La répartition des activités caséolytique, BAPA-asic et anti-trypsin dans les albumines et les globulines d'axes germinatifs et de cotylédons est décrite. Les axes ont des activités enzymatiques spécifiques supérieures à celles des cotylédons. Seules les activités caséolytiques albuminiques sont fortement augmentées après capture des inhibiteurs anti-trypsin. Les globulines sont dépourvues d'activité BAPA-asic. Sur gel de polyacrylamide, les inhibiteurs anti-trypsin globuliniques sont identiques, qu'ils proviennent de l'axe ou des cotylédons, et ne diffèrent que par une bande des inhibiteurs albuminiques.

INTRODUCTION

Les graines de Légumineuses contiennent une grande variété d'enzymes protéolytiques [1]. Il existe d'autre part dans ces graines des inhibiteurs (protéiques) d'enzymes protéolytiques animales (trypsin et chymotrypsin par exemple) dont le rôle physiologique dans la plante n'a pas encore été établi [1-4]. Curieusement ces inhibiteurs ne sont généralement pas efficaces sur les enzymes protéolytiques de la plante ou de l'organe végétal dont ils sont extraits. Les travaux relatant une interaction inhibiteurs-protéases sont rares et ne concernent pas les Légumineuses. Il s'agit des recherches sur les graines de laitue [5,6], l'orge [7], et les tubercules de pomme de terre [8,9].

Une récente publication de Filho [10] mentionne cependant que la fraction inhibitrice dont il

suit l'évolution au cours de la germination des graines de *Vigna sinensis* (L.) Savi, est faiblement active sur les protéases de la graine. Nous avons d'autre part montré [11] que des inhibiteurs anti-trypsin purifiés extraits des albumines cotylédonaires de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., inhibent l'activité caséolytique d'enzymes présentes dans cette même famille. Ces inhibiteurs sont toutefois inactifs vis-à-vis d'une autre catégorie d'enzymes protéolytiques albuminiques: les BAPA-ases (enzymes hydrolysant le substrat artificiel BAPA: α -N-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide). Ces résultats suggèrent que ces inhibiteurs anti-trypsin pourraient jouer un rôle important de régulateurs lors de la germination en modulant l'activité des enzymes protéolytiques puisqu'ils ont vis-à-vis de ces dernières des affinités très spécifiques.

Tableau 1. Activités caséolytique et BAPA-asique des albumines et des globulines d'axe et de cotylédons

Extraits*	Activité caséolytique U/mg† protéine	Activité caséolytique U/2 cot. ou axe (poids frais)	Activité BAPA-asique U/mg protéine	Activité BAPA-asique U/2 cot. ou axe (poids frais)
G axe	10,34	1,059	0	0
G-I axe	8,52			
A axe	2,55	0,23	47,7	4,34
A-I axe	4,62			
G cot.	1,92	14,04	0	0
G-I cot.	1,84			
A cot.	0,708	1,73	22,9	55,87
A-I cot.	2,66			

* Intacts (A, albumine et G, globuline) et débarrassés des inhibiteurs anti-trypsine (A-I et G-I).

† U = μ g de trypsine ayant une activité équivalente à celle de l'échantillon étudié.

Afin de déceler les interactions inhibiteurs-protéases dans la graine et d'avoir une vue plus claire des mécanismes de régulation de l'activité de ces enzymes par les inhibiteurs, il est nécessaire de connaître leur répartition dans la graine. Nous nous proposons dans cet article d'étudier les activités anti-trypsine et protéolytiques au sein des albumines et des globulines d'axes germinatifs et de cotylédons de graine quiescente de *V. unguiculata*.

RESULTATS

Nous allons rechercher dans les diverses familles protéiques mentionnées dans l'introduction: d'une part l'activité protéolytique vis-à-vis de la caséine, d'autre part vis-à-vis du BAPA. Les cinétiques d'activité enzymatique sont effectuées d'abord en présence de taux croissant d'albumines (A) ou de globulines (G) extraits de cotylédons et d'axes germinatifs, puis en présence de taux croissant d'albumines (de cotylédons et d'axes) débarrassées des inhibiteurs anti-trypsine (I)—nous les appellerons: (A-I)—ou de globulines ayant subi le même traitement, soit: (G-I). La comparaison des cinétiques de digestion réalisées avec (A), (A-I), (G) et (G-I) permettra d'évaluer l'influence des inhibiteurs anti-trypsine sur les deux activités enzymatiques testées.

Les inhibiteurs anti-trypsine extraits de chacune des familles sont partiellement caractérisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Activités caséolytique et BAPA-asique

Nous avons mis en évidence dans les albumines cotylédonaires [4,11] une activité caséolytique et

une activité BAPA-asique. La première augmente fortement après capture des inhibiteurs anti-trypsine, la seconde n'est pas sensible à ces inhibiteurs. Qu'en est-il des albumines d'axes germinatifs? Les cinétiques de digestion de la caséine par des taux croissants d'(A) et d'(A-I) sont linéaires et révèlent que les albumines d'axes ont une activité caséolytique 3,6 fois supérieure à celle des cotylédons (Tableau 1). L'activité caséolytique des albumines d'axes, comme celle des cotylédons, est fortement augmentée après capture des inhibiteurs anti-trypsine (d'un facteur de 1,8, Tableau 1).

Les cinétiques d'hydrolyse du BAPA montrent que les albumines d'axes sont susceptibles de digérer ce substrat, qu'elles sont 2,1 fois plus actives que les albumines cotylédonaires (Tableau 1) et que les enzymes responsables de cette hydrolyse sont insensibles aux inhibiteurs anti-trypsine. En effet, les cinétiques réalisées avec (A) et (A-I) sont identiques, comme dans le cas des albumines de cotylédons.

Les globulines d'axes et de cotylédons présentent aussi une activité caséolytique, mais particulièrement élevée dans le cas des globulines d'axes. Celles-ci ont une activité spécifique d'environ 5,4 fois supérieure à celle des globulines de cotylédons (Tableau 1). Contrairement à l'activité caséolytique des albumines, l'activité des globulines est insensible aux inhibiteurs anti-trypsine. L'activité de (G-I) est même légèrement inférieure à celle de (G): Tableau 1, cela provient vraisemblablement d'une dénaturation partielle des enzymes caséolytiques de globulines au cours de la capture des inhibiteurs anti-trypsine.

Les activités BAPA-asiques des globulines sont nulles. Elles restent nulles même après capture des

Tableau 2. Comparaison des activités anti-trypsine des globulines et des albumines d'axe et de cotylédons de graine quiescente de *Vigna*

Extraits*	μg nécessaires pour inhiber 10 μg de trypsine	μg de trypsine inhibés/ mg d'axe ou de cotylédon (poids frais)
G axe	100	3,35
A axe	25	11,9
G cot.	100	6,53
A cot.	25	8,8

* G, globulines. A, albumine.

inhibiteurs anti-trypsine. Ces inhibiteurs auraient pu masquer l'activité d'éventuelles BAPA-ases globuliniques totalement. Ce n'est pas le cas.

Rapport des activités totales: axe/cotylédons pour une graine.

Dans le Tableau 1 sont comparées les activités caséolytique et BAPA-asique spécifiques d'albumines, de globulines, d'(A-I) et de (G-I) d'axes et de cotylédons. Pour chacune de ces activités, le nombre de μg de trypsine produisant la même activité est calculé. La trypsine (E.C. 3.4.4.4. Sigma, trypsine de pancréas de boeuf) est capable d'hydrolyser les deux substrats: caséine et BAPA, et peut servir de référence. L'activité caséolytique de 5 μg de trypsine est: $\text{DO}_{280\text{nm}} \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1} = 2,65$, l'activité BAPA-asique de 100 μg de trypsine est: $\text{DO}_{410\text{nm}} \cdot 10^3 \cdot \text{min}^{-1} = 48$.

Le poids moyen de l'axe germinatif d'une graine de *Vigna* est 3,06 mg et celui des deux cotylédons

(sans les téguments): 112 mg. Un axe donne 0,1025 mg de globulines et 0,091 mg d'albumines, les deux cotylédons produisent 7,31 mg de globulines et 2,44 mg d'albumines (ces quantités de protéines sont dosées selon la méthode de Lowry *et al.* [18]. Les quantités minimums de protéines requises pour inhiber l'activité de 10 μg de trypsine sont données au Tableau 2, ainsi que les activités anti-trypsine par axe et pour deux cotylédons.

Inhibiteurs anti-trypsine purifiés

Les inhibiteurs anti-trypsine de chaque famille protéique sont captés sur la résine-trypsine insoluble, puis élusés à pH acide (voir matériel et méthodes). On vérifie le pouvoir inhibiteur de chaque éluat sur l'activité BAPA-asique d'une solution de référence de trypsine. Les solutions d'inhibiteurs sont ensuite déssalées et lyophilisées. Les fractions inhibitrices ainsi recueillies sont appliquées sur gel de polyacrylamide. Les diagrammes électrophorétiques sont comparés (Fig. 1). Chaque fraction est composée de 4 ou 5 bandes, dont une majeure (la plus anodique) qui est commune au quatre fractions. Les autres bandes mineures ne présentent que de faibles différences de migration et correspondent sans doute à des inhibiteurs modifiés par leur passage sur la résine-trypsine, comme nous l'avons déjà suggéré dans l'article précédent concernant les inhibiteurs anti-trypsine des albumines cotylédonaires du *Vigna* [11].

DISCUSSION

Les données résumées dans le Tableau 1, montrent l'existence dans les albumines et les globulines extraites des deux parties de la graine de *Vigna*: axe germinatif et cotylédons, d'enzymes à activité caséolytique. La plus forte activité spécifique se rencontre dans les globulines d'axe, puis par

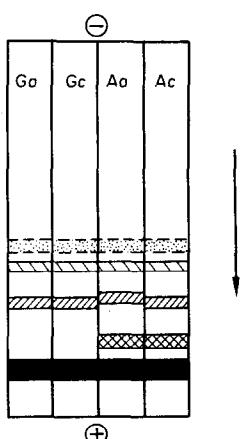


Fig. 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 7,5% des fractions inhibitrices anti-trypsine extraites des globulines d'axe (Ga), des globulines de cotylédons (Gc), des albumines d'axe (Aa) et des albumines de cotylédons (Ac). Coloration au noir-amide.

ordre décroissant, dans les albumines d'axe, les globulines de cotylédons et enfin dans les albumines cotylédonaires. Les axes germinatifs ont une activité spécifique totale (albumines et globulines) plus forte que celle des cotylédons.

Les inhibiteurs anti-trypsine sont inactifs sur les enzymes caséolytiques globuliniques. En revanche, la capture des inhibiteurs augmente l'activité caséolytique des albumines cotylédonaires d'un facteur de 3,46 et celle des albumines d'axe d'un facteur de 1,8. Une part importante de l'activité caséolytique des albumines est donc masquée par des inhibiteurs anti-trypsine dans la graine quiescente.

L'activité BAPA-asiique est nulle dans les globulines d'axes et de cotylédons, mais non dans les albumines. Les albumines d'axe présentent une activité spécifique supérieure à celle des cotylédons. Les inhibiteurs anti-trypsine sont sans effet sur ces enzymes. Il semble donc exister dans la graine trois enzymes ou trois catégories d'enzymes différentes: des caséinases albuminiques sensibles aux inhibiteurs anti-trypsine, des caséinases globuliniques et des BAPA-ases albuminiques insensibles aux inhibiteurs.

Qu'en est-il des activités au niveau de la graine? D'une part, l'activité protéolytique totale des cotylédons (activité caséolytique et BAPA-asiique des albumines et des globulines) équivaut à celle de 71,64 µg de trypsine et est 12,7 fois supérieure à celle de l'axe (5,63 µg de trypsine). D'autre part, les deux cotylédons d'une graine sont capables d'inhiber 1703 µg de trypsine, soit 36 fois plus que les 47 µg qu'un axe inhibe.

L'analyse comparative sur gel de polyacrylamide des inhibiteurs extraits des quatre familles (albumines et globulines d'axe et de cotylédons) montre qu'il s'agit de molécules très voisines sinon identiques, en tout cas de structure et de poids moléculaire très proches puisqu'ils migrent tous de manière semblable. La bande majeure (la plus anodique) se trouve au même emplacement pour les quatre fractions inhibitrices (Fig. 1).

Les résultats de l'analyse partielle effectuée sur la fraction inhibitrice extraite des albumines cotylédonaires de *Vigna* [11], montrant que les molécules composant cette fraction ont un poids moléculaire voisin de 12000 et qu'elles sont très riches en cystine (19%), peuvent sans doute s'appliquer aux trois autres fractions inhibitrices vu leur simili-

tude de comportement sur gel de polyacrylamide.

Quelle est l'utilité des inhibiteurs anti-trypsine dans les globulines d'axes et de cotylédons? Ils sont en effet inactifs sur les enzymes caséolytiques des globulines et l'activité BAPA-asiique est nulle dans ces familles. Il existe sans doute dans les globulines d'autres enzymes protéolytiques, non révélées par nos méthodes, et qui seraient sensibles à ces inhibiteurs. Nous poursuivons l'analyse de ces fractions globuliniques qui constituent les réserves de la graine, afin d'élucider le rôle tenu par ces molécules inhibitrices anti-trypsine.

A l'échelle d'une graine, nous avons souligné que l'activité anti-trypsine était très supérieure aux activités protéolytiques testées, tant pour l'axe que pour les cotylédons. Le rôle de cet excédent d'inhibiteurs reste encore à déterminer.

Une recherche de la répartition *in vivo* par fractionnement cellulaire, des inhibiteurs et des enzymes protéolytiques, est aussi en cours dans notre laboratoire. Cette recherche, conjointement à l'étude biochimique réalisée au niveau des familles protéiques décrite dans cet article, permettra une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des protéases qui jouent un rôle central lors de la germination et de la présence des inhibiteurs anti-trypsine très répandus chez les Légumineuses.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les graines sélectionnées de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., en provenance du Zaïre, nous ont été fournies par la Faculté des sciences agronomiques de Gembloux (Belgique). Elles sont conservées en atmosphère sèche (P_2O_5) à 2°.

Préparation des albumines et des globulines. Les graines sont décortiquées, cotylédons et axe germinatif sont séparés. L'extraction des albumines et des globulines a déjà été décrite dans nos articles précédents [11,12].

Extraction des inhibiteurs anti-trypsine. Chaque extrait protéique est agité avec la résine insoluble: EMA-trypsine (Miles Yeda Ltd.) en milieu alcalin (tampon triéthanolamine-HCl 0,2 M, NaCl 0,1 M, CaCl₂ 0,01 M pH 7,8) [13]. Les inhibiteurs anti-trypsine contenus dans les extraits se fixent sélectivement sur la résine. Les quantités relatives de résine et d'extrait sont déterminées de manière à ce que la totalité des inhibiteurs soit captée. Après centrifugation, l'on obtient d'une part l'extrait débarrassé des inhibiteurs et d'autre part un culot de résine-trypsine-inhibiteurs. 5 Elutions avec un tampon acide (HCl-KCl 0,2 M, pH 1,6) sont nécessaires pour décrocher les inhibiteurs de la trypsine insoluble. Les éluats sont rassemblés, déssalés, lyophilisés.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide. L'analyse des 4 fractions inhibitrices obtenues est faite sur gel 7,5% [14]. La migration se fait sous une intensité de 2 mA/tube (5 × 75 mm). Les gels sont fixés et colorés immédiatement après migration dans une solution 1% de noir-amide dans AcOH 7,5%.

Activités enzymatiques. L'activité caséolytique est déterminée selon la méthode de Kunitz [15], modifiée par Kakade *et al.* [16]. La caséine (2% dans du tampon phosphate 0,067 M pH 7,0, additionnée de NaCl 2% dans le cas des globulines) est incubée avec l'extrait testé de 90 à 150 min selon les cas, à 37°. Les protéines sont précipitées par l'acide trichloroacétique 25%, et les acides aminés libres sont dosés dans le surnageant à 280 nm.

L'activité BAPA-asylique est révélée par la méthode d'Erlanger *et al.* [17]. Lorsque l'on teste l'activité des extraits globuliniques, du NaCl 2% est ajouté à la solution tamponnée de BAPA, afin d'avoir une force ionique suffisante. La *p*-nitroaniline jaune libérée au cours de la digestion du BAPA, est dosée colorimétriquement à 410 nm.

Dosage des protéines en solution. La teneur en protéines des extraits albuminiques ou globuliniques est déterminée par la méthode de Lowry *et al.* [18].

BIBLIOGRAPHIE

1. Ryan, C. A. (1973) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**, 173.
2. Liener, I. E. (1969) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. (Liener, I. E., ed.) pp. 8-53, Academic Press, New York.
3. Dechary, M. (1970) *Econ. Botany* **24**, 113.
4. Royer, A. (1974) *Les Protéines des Graines. Genèse, Nature et Fonction* (Miege, J., ed.) Editions du Conservatoire Botanique, Genève. Sous presse.
5. Shain, Y. et Mayer, A. M. (1965) *Physiol. Plant.* **18**, 853.
6. Shain, Y. et Mayer, A. M. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1491.
7. Kirsi, M. et Mikola, J. (1971) *Planta*, **96**, 281.
8. Hojima, Y., Tanaka, M., Moriya, H. et Moriwaki, C. (1971) *Allergy*, **20**, 755.
9. Hojima, Y., Tanaka, M., Moriya, H. et Moriwaki, C. (1971) *Allergy*, **20**, 763.
10. Filho, J. X. (1973) *Physiol. Plant.* **28**, 149.
11. Royer, A., Miege, M. N., Grange, A., Miege, J. et Mascherpa, J. M. (1974) *Planta*. Sous presse.
12. Miege, M. N. (1970) *Arch. Sci. Genève*, **23**, 75.
13. Fritz, H., Brey, B., Muller, M. et Gcbhart, M. (1971) *Proceedings on Proteinase Inhibitors*, Munich, Nov. 1970 (Fritz, H. and Tschesche, H., eds.) pp. 28-37, Walter de Gruyter, Berlin.
14. Maurer, H. R. (1971) *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Fischbeck, K., ed.) pp. 44-45, Walter de Gruyter, Berlin.
15. Kunitz, M. (1947) *J. Gen. Physiol.* **30**, 291.
16. Kakade, M. L., Simons, N. et Liener, I. E. (1969) *Cereal Chem.* **46**, 518.
17. Erlanger, B. F., Kokowsky, N. et Cohen, W. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **95**, 271.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265.