

Biologie et pathologie végétales / Plant biology and pathology

Les protéines de réserve du pin pignon (*Pinus pinea* L.)

Nizar Nasri*, Saïda Triki

Laboratoire de biochimie des protéines et des lipides, Campus universitaire, Tunis 2092, Tunisie

Reçu le 25 septembre 2006 ; accepté après révision le 22 mars 2007

Disponible sur Internet le 9 mai 2007

Présenté par Philippe Morat

Résumé

Les graines de pin pignon (gymnosperme, Pinaceae) sont employées depuis l'Antiquité comme produit culinaire dans les régions méditerranéennes. Elles sont assez riches en protéines (25% du PS). La solubilisation des différentes classes protéiques et leur fractionnement par SDS-PAGE montrent qu'elles sont riches en globulines (75% des protéines totales), qui sont formées de sous-unités de PM variant de 10 à 150 kDa. Les albumines représentent seulement 15%, avec trois sous-unités, d'environ 14, 24 et 46 kDa. La fraction des glutélines, les moins solubles, ne se présente qu'en faibles proportions (10%). Les sous-unités constitutives ont des PM fréquents de 43 kDa. Les prolamines sont très peu représentées (1 à 2%). **Pour citer cet article :** N. Nasri, S. Triki, *C. R. Biologies 330 (2007)*.

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Storage proteins from seeds of *Pinus pinea* L. The Mediterranean stone pine *Pinus pinea* L. (gymnosperm, Pinaceae) is much appreciated for its seed production, widely used in food preparation in the Mediterranean Basin. Seeds contain 25% proteins on a dry-weight basis. *Pinus pinea* accumulates globulins as major storage proteins in seeds (75% of total storage proteins), composed of several subunits of 10 to 150 kDa, revealed by SDS-PAGE. The albumin fraction (15%) represents three subunits of 14, 24 and 46 kDa. Glutelins, the least soluble fraction, represents a small proportion (10%). Their constitutive units have frequent PM of 43 kDa. Prolamins also represent a very small percentage (1 to 2%). **To cite this article:** N. Nasri, S. Triki, *C. R. Biologies 330 (2007)*.

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : *Pinus pinea* L.; Protéines de réserve; Fractionnement; Globulines; SDS-PAGE

Keywords : *Pinus pinea* L.; Seed storage proteins; Fractionation; Globulin; SDS-PAGE

Abridged English version

The Mediterranean stone pine *Pinus pinea* L. (gymnosperm, Pinaceae) is much appreciated for its seeds,

widely used in a lot of traditional dishes, such as cakes. Seeds have a significant chemical composition and a nutritive value, since they are highly oleaginous and rich in vitamins, in potassium and in phosphorus. Nevertheless, literature data on storage proteins of this species are very limited; there has been no report concerning the storage proteins of *Pinus pinea*.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : nizar.nasri@fst.rnu.tn (N. Nasri).

In this study, we report the fractionation and the characterization by SDS-PAGE of the proteins of *Pinus pinea* L., and particularly a protocol designed to extract all the categories of storage proteins (albumins, globulins, prolamins, and glutelins), based on their solubility. Mature seeds, sampled from seven Mediterranean populations (from Tunisia, Spain, France, Greece, Italy, Morocco, and Turkey) were used.

Seeds contain 25% proteins on a dry-weight basis. *P. pinea* accumulates globulins as major proteins (75% of total storage proteins), composed of several subunits of 10 to 150 kDa, as revealed by SDS-PAGE. Globulins' profiles are comparable for all populations, and no variability among these populations was revealed.

The albumin fraction (15%) represents three subunits of 14, 24, and 46 kDa. As for glutelins, the least soluble, they are represented in small proportions (10%). Their constitutive units have frequent PM of 43 kDa. Prolamins also represent very small proportions (1 to 2%).

1. Introduction

Outre la valeur industrielle de son bois, le pin pignon est apprécié pour sa production fruitière. Les graines sont oléagineuses et particulièrement riches en lipides, 45–50% du poids sec de la graine [1], en vitamines et en sels minéraux [2]. Les protéines de réserve constituent actuellement l'aliment de base de l'homme. Le besoin protéique journalier avoisine 0,8 g de protéine/jour/kg, soit environ 56 g de protéines par jour pour un homme de 70 kg [3]. Les protéines de réserve végétales fournissent plus de la moitié des protéines totales et sont constituées d'un mélange, en proportions variables, de diverses catégories de protéines réparties depuis fort longtemps par Osborne [4] en classes ou groupes sur la base de leur solubilité : les albumines sont solubles dans l'eau et les globulines dans les solutions salines. Les prolamines sont solubles dans les alcools dilués comme l'éthanol à 70% ou l'isopropanol à 55%. Les glutélines et les protéines résiduelles sont partiellement solubles dans les solutions acides ou alcalines diluées.

Les différences en proportions entre ces diverses fractions protéiques illustrent souvent la valeur nutritive des graines. Les légumineuses sont plus riches en albumines et en globulines, tandis que les céréales sont riches en prolamines et glutélines. Par ailleurs, les légumineuses ont des teneurs plus élevées en protéines (20 à 40% du PS), alors que les céréales n'en contiennent, en général, pas plus de 10 à 15% [5]. Enfin, les albumines et les globulines sont plus riches en lysine, acide aminé essentiel, tandis que les prolamines et les gluté-

lines sont plus riches en acides aminés soufrés. Allona et al. [6,7] ont étudié les caractéristiques des globulines de *Pinus pinaster* et indiquent qu'elles appartiendraient à la famille des globulines 7S. De plus, ces mêmes auteurs [8] ont pu purifier et caractériser les globulines de faible PM, qui présentent une structure dimérique, c'est-à-dire qu'elles sont constituées d'une grande et d'une petite sous-unité, liées par des ponts disulfure. Elles sont riches en arginine et en cystéine.

Les graines de pin pignon sont employées depuis l'Antiquité comme produit culinaire dans les régions méditerranéennes. Au Moyen-Orient et en Tunisie, elles sont utilisées en pâtisserie.

Dans ce travail, nous envisageons d'étudier le fractionnement et la caractérisation par SDS-PAGE des protéines de réserve de *Pinus pinea* L. en vue d'illustrer la valeur nutritive des graines de cette espèce.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Des graines mûres de pin pignon ont été utilisées dans cette étude. Les graines locales proviennent de la population Bechateur (37°26'N, 9°89'E), une population côtière du Nord de la Tunisie (BE). Afin d'ouvrir les cônes mûrs récoltés, la technique de Franclet a été utilisée ; elle préconise leur trempage pendant 15 secondes dans de l'eau bouillante, afin de provoquer des ruptures dans les joints de résine scellant les écailles. Les cônes, sortis de l'eau bouillante, sont placés directement dans une enceinte de séchage par l'air chaud et sec ; ils s'ouvrent ainsi rapidement et simultanément.

Les graines de pin pignon provenant du Maroc et de populations européennes ont été fournies par l'unité de recherches forestières méditerranéennes d'Avignon (Inra). Elles proviennent de six pays (Fig. 1) :

- Espagne (population « Cordillera Central », E2) ;
- France (population « Saint-Aygulf », F2) ;
- Grèce (population « Grèce Agios », G2) ;
- Italie (population « Feniglia », I) ;
- Maroc (population « Mezzine », M1) ;
- Turquie (population « Izmir », T2).

2.2. Analyse des protéines de réserve

2.2.1. Extraction des différentes classes de protéines de réserve du pin pignon

Afin d'extraire toutes les classes des protéines de réserve du pin pignon, nous avons mis au point un protocole de fractionnement des différentes catégories

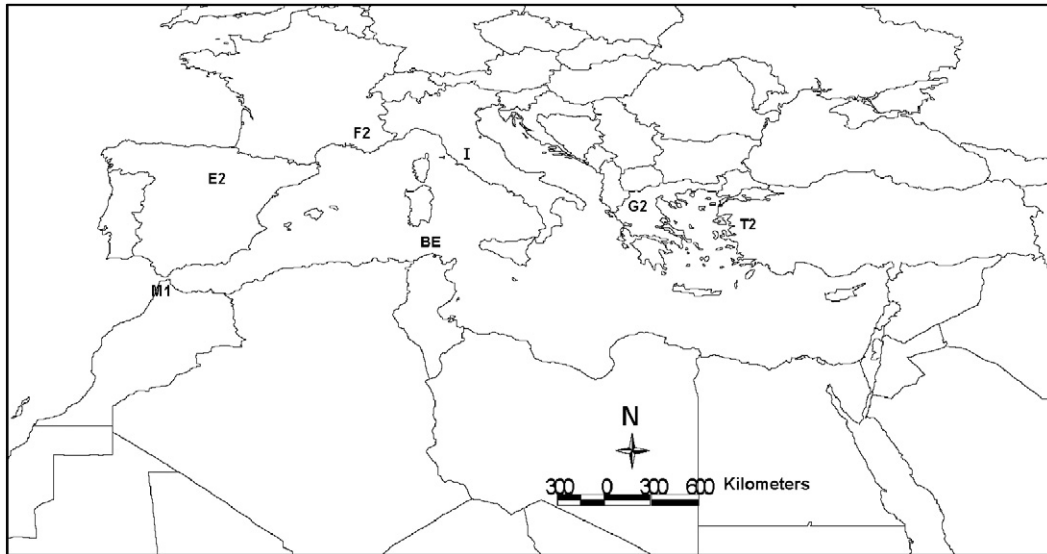


Fig. 1. Localisation géographique des populations étudiées.

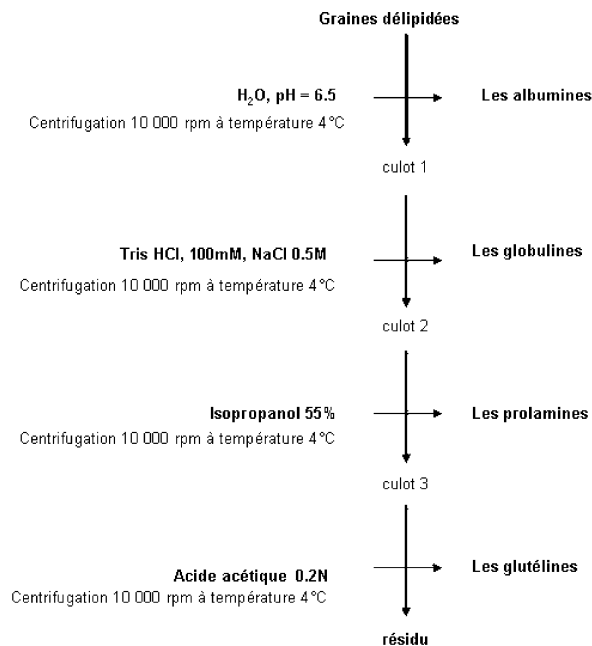


Fig. 2. Protocole expérimental de l'extraction des différentes classes de protéines de réserve des graines de pin pignon.

de protéines, se basant sur leurs différences de solubilité [4]. Puis la concentration en protéines de chaque fraction est déterminée par la méthode de Bradford [9]. L'ensemble des étapes du fractionnement est résumé dans la Fig. 2.

Les graines, préalablement délipidées au Soxhlet, sont broyées énergétiquement dans de l'eau distillée à raison de 0,1 g/10 ml de tampon. L'homogénat est cen-

trifugé à 10 000 rpm à 4 °C pendant 20 min. Un aliquote du surnageant, qui contient les albumines solubles, est récupéré pour le dosage des protéines.

Ensuite, le premier culot est homogénéisé de nouveau dans une solution de Tris HCl 100 mM, NaCl 0,5 M de pH = 8,1, pour l'extraction de la fraction globulines, après centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment. De même, le culot 2 est repris dans une solution d'isopropanol à 55% ; après homogénéisation et centrifugation, les prolamines sont récupérées. Enfin, le culot 3 servira pour l'extraction des glutélines par une solution d'acide acétique 0,2 N.

2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

L'estimation des quantités de chaque catégorie de protéines est réalisée selon la méthode de dosage de Bradford [9].

À 50 µl d'extrait de protéines sont ajoutés 50 µl d'eau distillée et 2 ml de réactif de bleu de Coomassie, préparé comme suit : 100 mg de poudre de bleu de Coomassie G 250 sont dissous dans 50 ml d'éthanol absolu, puis on y ajoute 100 ml d'acide orthophosphorique à 85%. Le mélange résultant est ajusté avec de l'eau distillée à un volume final de 1000 ml, puis filtré et conservé à froid (4 °C).

Après stabilisation de la couleur pendant 5 min, la densité optique du mélange est déterminée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (LKB – Spectronic 20D+).

Les concentrations sont déterminées par référence à une gamme étalon à base de BSA, dont la concentration

varie de 0 à 150 µg, préparée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

2.2.3. Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide

La méthode utilisée dans ce travail est l'électrophorèse verticale sur plaque en mini-gel de polyacrylamide (80 × 85 mm) contenant 12 puits, décrite par Laemmli (1970). Dans cette méthode, on admet que les complexes SDS protéines (conditions dénaturantes) possèdent une même charge globale négative. Dans ce cas, seul le paramètre encombrement moléculaire intervient dans la vitesse de migration et, donc, dans la séparation des protéines.

2.2.3.1. Composition et préparation des gels. Les gels de polyacrylamide sont constitués de deux zones. Ils sont coulés entre deux plaques en verre. La partie supérieure constitue le gel de concentration, dont le rôle est de rassembler les protéines, déposées, en haut du gel de séparation. Dans cette zone, la concentration en acrylamide est de 3% et la concentration des protéines est possible grâce au pH de la solution tampon du gel, qui est égal à 6,8, très voisin du p*H*_i de la glycine. La partie inférieure, qui possède la proportion la plus importante, constitue le gel de séparation où la concentration en acrylamide est de 10%. Cette concentration détermine la réticulation de l'acrylamide. Le gel est préparé dans une solution tampon de pH 8,6. La polymérisation des gels a lieu en présence d'un catalyseur tel que le Temed et d'un activateur comme le persulfate d'ammonium.

2.2.3.2. Préparation des échantillons et migration des protéines. Nous avons effectué des électrophorèses en présence de SDS dans un tampon de migration de pH = 8,6. L'électrophorèse dure environ 2 h sous une différence de potentiel de 120 V et un ampérage de 20 mA, jusqu'à migration complète du bleu de bromophénol.

Au préalable, les extraits de chaque catégorie de protéines sont précipités à -20 °C dans l'acétone (1:4, v/v). On ajoute 1 ml d'acétone à 250 µl d'échantillon. Le mélange ainsi obtenu est conservé pendant 30 min à 1 h à -20 °C, puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 15 min. Par la suite, l'acétone est éliminée. Le culot protéique est porté pendant 15 min à 37 °C, puis repris dans 100 µl de tampon de charge.

Pendant les dépôts, les échantillons de protéines sont maintenus à chaud au bain-marie, afin d'empêcher la cristallisation des sels; qui générerait la migration des molécules protéiques.

L'évaluation des masses moléculaires des polypeptides séparés est possible par référence à des marqueurs

de masses moléculaires connues (*Promega, Madison, États-Unis*), déposés dans les mêmes conditions opératoires.

2.2.3.3. Révélation des protéines. Après électrophorèse, les protéines sont fixées et colorées dans une solution de bleu de Coomassie Brillant R-250 (Sigma) à 0,25% (m/v). Après coloration, l'excès de colorant est retiré à l'aide d'une solution formée d'un mélange de méthanol, d'acide acétique et d'eau distillée (3:1:6, v/v/v). Les gels sont ensuite rincés abondamment à l'eau.

2.3. Analyse statistique des données

L'analyse de la variance et la comparaison multiple des moyennes (test de Student) ont été utilisées dans cette étude.

De plus, pour évaluer les informations fournies par les teneurs des différentes classes protéiques, l'analyse en composante principale (ACP) a été appliquée sur les teneurs des trois classes majeures (albumines, globulines et glutélines). L'ACP est une technique d'emploi commun qui permet de visualiser les données et de trouver d'autres vraies dimensions d'un échantillonnage. L'ACP génère un ensemble de nouvelles variables (axes), de nouvelles combinaisons linéaires des variables originelles, afin que la valeur maximale de la variance contenue dans l'échantillonnage (information) soit concentrée dans les premiers composants principaux [10].

3. Résultats

3.1. Teneurs en protéines de réserve de pin pignons des différentes populations méditerranéennes

Afin de déterminer les teneurs des protéines de réserve du pin pignon, des graines préalablement délipidées sont utilisées. Les résultats des dosages ont permis de donner des estimations des protéines totales solubilisées ainsi que les différentes classes de protéines de réserve (Tableau 1).

L'examen des données du Tableau 1 permet de remarquer que les graines de pin pignon sont riches en protéines, avec environ 244,06 mg/g MS, soit environ 25% du PS. Les globulines sont les protéines majeures: elles forment 74,74% des protéines totales, suivi par les albumines et les glutélines, qui forment respectivement 14,42% et 9,33%. La fraction prolamine est très peu présente, avec seulement 1,48%. De plus, l'analyse de la

Tableau 1

Teneurs en protéines et compositions en classes protéiques de réserve des graines des populations méditerranéennes de pin pignon

Solvants	Classes protéiques	Teneurs en protéines des populations méditerranéennes mg/g MS*								% en protéines totales
		BE	E1	F1	G1	IT	M1	T1	moyenne mg/g MS	
H ₂ O	Albumines	39,89	34,71	28,69	34,85	27,98	43,87	36,46	35,21	14,42%
Tris HCl, 100mM, NaCl 0,5 M	Globulines	192,01	181,82	177,25	182,17	172,55	189,52	181,68	182,43	74,74%
Isopropanol 55%	Prolamines	4,90	3,53	3,28	3,57	3,92	3,14	3,12	3,64	1,48%
Acide acétique 0,2 N	Glutélines	12,37	41,71	14,40	17,47	41,00	15,76	16,83	22,79	9,33%
Somme		249,17	261,77	223,62	238,06	245,45	252,29	238,09	244,06 mg/g MS	soit 24,4%

* : chaque valeur est la moyenne de trois répétitions.

Tableau 2

Résultats de l'analyse de la variance à un facteur, portant sur les teneurs des différentes classes de protéines de réserve de pin pignon des populations méditerranéennes

Classes	Source de variation	C.M. ^a	ddl ^b	F _{calculé} ^c
Albumines	Population	581,27	6	1,60
	Résiduelle	96,87	14	
Globulines	Population	802,46	6	0,45
	Résiduelle	133,74	14	
Prolamines	Population	7,03	6	0,65
	Résiduelle	1,17	14	
Glutélines	Population	2945,18	6	0,78
	Résiduelle	490,86	14	

F_{théorique} = 2,96 à 0,05 et 4,69 à 0,01.^a : Carrés moyens; ^b : degré de liberté; ^c : facteur Snedecor-Fisher.

variance des teneurs dans les différentes classes des protéines de toutes les populations méditerranéennes étudiées montre que tous les tests ne sont pas significatifs (Tableau 2). Quelle que soit la classe considérée, le pin pignon montre une faible variabilité de composition. De même, la comparaison multiple des moyennes des teneurs dans les différentes classes protéiques ne montre pas de différence significative (Tableau 3).

3.2. Fractionnement des classes des protéines de réserve de pin pignon

La solubilisation des différentes classes protéiques des graines et leur fractionnement par électrophorèse nous ont permis de caractériser les PM des sous unités de chaque classe (Figs. 3–5). La population de Bechauteur (Tunisie) a servi à cette analyse.

Les résultats indiquent que les globulines sont formées d'une quantité importante de sous unités de PM inférieurs à 10 kDa (G6) et d'autres d'environ 12 kDa (G5). Des chaînes moins abondantes de PM élevés ont des valeurs de 40–50 kDa (G3 et G4). Enfin, de très faibles bandes sont révélées au niveau des PM 75 et

Tableau 3

Résultats de l'analyse de la comparaison multiple des moyennes des teneurs des différentes classes de protéines de réserve des populations méditerranéennes

Descripteur	Moyenne	Groupement SNK ^a	Populations ^b
Albumines	27,98	A	I
	28,69	A	F2
	34,71	A	E2
	34,85	A	G2
	36,46	A	T2
	39,89	A	BE
	43,87	A	M1
Globulines	172,55	A	I
	177,25	A	F2
	181,68	A	T2
	181,82	A	E2
	182,17	A	G2
	189,52	A	M1
	192,01	A	BE
Prolamines	3,12	A	T2
	3,14	A	M1
	3,28	A	F2
	3,53	A	E2
	3,57	A	G2
	3,92	A	I
	4,90	A	BE
Glutélines	12,37	A	BE
	14,40	A	F2
	15,76	A	M1
	16,83	A	T2
	17,47	A	G2
	41,00	A	I
	41,71	A	E2

^a : Groupement SNK : groupement Student–Newman et Keuls.^b : Les populations qui sont reliées par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes les unes des autres pour le seuil de probabilité fixé à 0,05.

150 kDa (G2 et G1). Les albumines de pin pignon présentent trois sous-unités d'environ 14 (A3), 24 (A2) et 46 (A3) kDa. Les albumines, en général faiblement re-

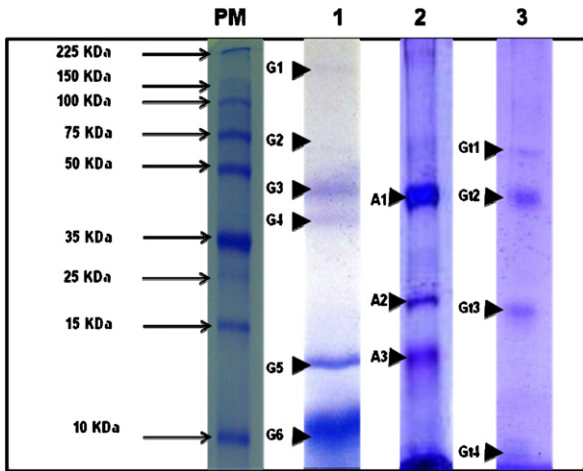


Fig. 3. Électrophorégramme des globulines (1), des albumines (2) et des glutélines (3) de graines de pin pignon de la population tunisienne de Bechateur (BE), sur gel SDS-PAGE (PM : marqueur de taille de protéines standards).

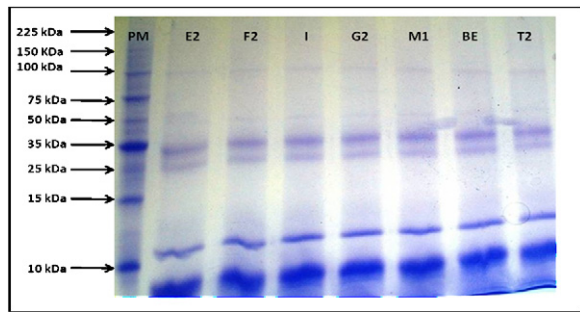


Fig. 4. Electrophoregramme des globulines des populations méditerranéennes (PM : marqueur de taille) ; Espagne (E2), France (F2), Italie (I), Grèce (G2), Maroc (M2), Tunisie (BE) et Turquie (T2).

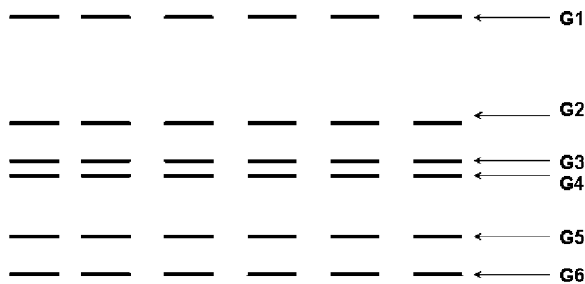


Fig. 5. Représentation schématique des électrophoregrammes des globulines.

présentées dans les graines, sont des protéines solubles de faible PM douées d’activités enzymatiques.

Quant aux glutélines, quatre sous-unités ont pu être révélées : ce sont Gt4, Gt3, Gt2 aux environs de 8, 20 et 43 kDa, respectivement, parmi lesquelles Gt2 est la

plus abondante. Une dernière bande Gt1, très faible, est estimée à 64 kDa.

Les graines de pin pignon semblent avoir une composition en protéines de réserve particulière où les globulines dominent. Cependant, Allona et al. [6,7,11] trouvent que les glutélines sont les principales protéines de réserve des graines de l’espèce *Pinus pinaster*. La fraction des globulines représente également un pourcentage élevé (26%). Les structures des glutélines sont dimériques, avec deux sous-unités de 21 et 34 kDa, liées par des ponts disulfure. Les globulines présentent deux sous-unités de PM 175–190 kDa, composées de monomères de 22, 27 et 47 kDa, reliées par des interactions faibles, et une autre sous-unité de 14 kDa, composée de dimères dont les chaînes sont reliées par des ponts disulfure.

En résumé, les graines de pin pignon semblent donc avoir une composition en protéines de réserve particulière, au sein de laquelle les globulines (caractéristiques des légumineuses) dominent, avec des sous-unités de faibles PM (5–10 kDa) et d’autres ayant des PM plus élevés (50 kDa). Les prolamines (caractéristiques des céréales) n’existent que sous forme de traces.

Quant aux glutélines, les moins solubles, elles sont présentes, bien qu’en faible proportion (10% des protéines totales). Les sous-unités constitutives ont des PM fréquents de 43 kDa.

3.3. Analyse du polymorphisme des globulines des populations méditerranéennes

Dans cette analyse, la fraction des globulines – classe majeure des protéines des graines de pin pignon – a été employée, afin d’évaluer une éventuelle diversité parmi les sept populations prospectées.

La séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), ne nous a pas permis de visualiser des différences au niveau des différents profils. Nous constatons que ceux-ci sont homologues pour toutes les populations. Ainsi, on ne peut distinguer aucune variabilité parmi ces populations. D’autres analyses complémentaires seraient nécessaires : ainsi, une électrophorèse bidimensionnelle permettrait de visualiser les différentes protéines dans leur état natif et fournirait peut-être des résultats, plus informatifs.

3.4. Analyse en composantes principales

Ayant remarqué des variations sensibles dans les teneurs en albumines et en glutélines selon l’origine géographique (Tableau 1), une analyse en composante

Tableau 4
Axes de l'ACP définis par la composition en albumines, globulines et glutélines des populations méditerranéennes de pin pignon

Composantes		PC 1	PC 2
% Inertie		77,608	20,243
% Cumulative		77,608	97,851
Caractères définissants des axes	Albumines	0,608	0,427
	Globulines	0,631	0,253
	Glutélines	-0,482	0,868

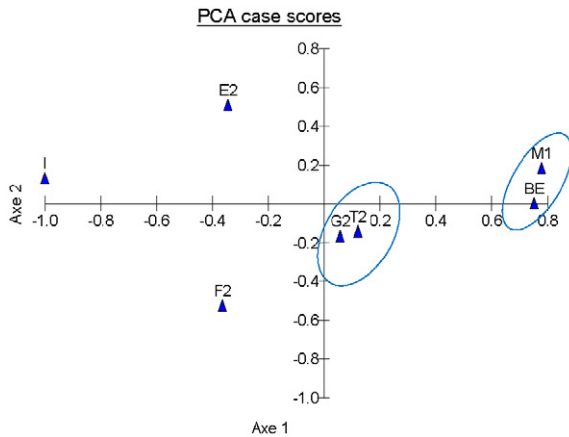


Fig. 6. Variabilité de composition en protéines de réserve des populations méditerranéennes, exprimée par l'analyse en composante principale. Dispersion des populations dans les plans formés par les axes 1 et 2 de l'ACP.

principale a été entreprise pour différencier les populations méditerranéennes en utilisant les teneurs des albumines, des globulines et des glutélines. De cette analyse, les deux axes d'inertie axe 1 et axe 2, qui expriment 97,851% de la variation totale, ont été retenus (Tableau 4).

Les deux axes d'analyse d'ACP, qui expriment 97,851% de la variation totale, sont représentés dans le Tableau 4. L'axe 1 explique 77,608% de la variation totale, et associe positivement les albumines et les globulines. Le long de l'axe 2, qui explique 20,243% de la variation, la variable la plus discriminante est la composition en glutélines.

La projection des données sur les plans définis par les axes d'inertie d'ACP (Fig. 6) montre que, malgré les variations sensibles de composition en protéines entre les différentes populations, une certaine structuration géographique peut être envisageable. En effet, les populations de Turquie (T2) et de Grèce (G2) forment un groupe de « populations de l'Est ». Les populations de Tunisie (BE) et du Maroc (M1) forment un groupe de « populations de l'Afrique du Nord ». Le reste des populations, individualisées, forme un troi-

sième groupe « Europe de l'Ouest », qui comprend les populations d'Espagne (E2), de France (F2) et d'Italie (I).

4. Conclusion

Les graines de pin pignon contiennent une quantité importante de protéines de réserve, soit environ 25% du PS.

Les globulines sont les protéines majeures, qui forment environ 75% des protéines totales. Les albumines et les glutélines forment respectivement 15% et 10%. La fraction prolamine est très peu représentée, avec seulement 1,48%. Ainsi, les graines de pin pignon semblent avoir une composition en protéines de réserve différente de celle d'un autre conifère, *Pinus pinaster* [6,7,11], au sein de laquelle les globulines dominent. Elles sont formées de nombreuses sous-unités (5–10 kDa) et d'autres moins abondantes, de PM plus élevé (50 kDa). Les prolamines, quant à elles, n'existent que sous forme de traces. Quant aux glutélines, elles sont présentes, bien qu'en faible proportion (10% des protéines totales); leurs sous-unités constitutives ont des PM aux environs de 43 kDa.

Bien que les électrophorogrammes des globulines des différentes populations méditerranéennes prospectées n'aient pas permis de distinguer une diversité quelconque parmi les populations méditerranéennes, une certaine structuration géographique semble exister. D'autres travaux seraient nécessaires afin de mieux cerner la qualité des protéines des graines de pin pignon et de la comparer à celles des autres représentants de la famille.

Références

- [1] N. Nasri, S. Triki, Analyse des lipides des graines de pins de Tunisie : *Pinus halepensis* Mill. et *Pinus pinea* L., Riv. Ital. Sostanze Grasse 81 (2004) 244–247.
- [2] C. Nergiz, I. Dönmez, Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds, Food Chem. (2004) 365–368.
- [3] J.-C. Cheftel, J.-L. Cuq, D. Lorient, Protéines alimentaires, Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1985 (309 p.).
- [4] T.B. Osborne, The Vegetal Proteins, second ed., Longeant, Green W., London, 1924.
- [5] J. Guéguen, J. Lemarié, Composition, structure et propriétés physiologiques des protéines légumineuses et d'oléagineux, in : B. Godon (Ed.), Protéines végétales, Lavoisier, Paris, 1996, pp. 1–40.
- [6] I. Allona, R. Casado, C. Aragoncillo, Seed storage proteins from *Pinus pinaster* Ait, Homology of major components with 11S proteins from angiosperms, Plant Sci. 87 (1992) 9–18.
- [7] I. Allona, C. Collada, R. Casado, C. Aragoncillo, Electrophoretic analysis of seed storage proteins from gymnosperms, Electrophoresis 15 (1994) 1062–1067.

- [8] I. Allona, C. Collada, R. Casado, C. Aragoncillo, 2S arginine-rich proteins from *Pinus pinaster* seeds, *Tree Physiol.* 14 (1994) 211–218.
- [9] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [10] M. Meloun, J. Militky, M. Forina, *Chemometrics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, New York, 1992.
- [11] I. Allona, R. Casado, C. Aragoncillo, Biochemical genetics of a 7S globulin-like protein from *Pinus pinaster* seeds, *Theor. Appl. Genet.* 88 (1994) 454–459.