

Ann. Génét. Sél. anim., 1976, **8** (4), 481-491.

POLYMORPHISME DES LACTOPROTÉINES DE BOVINÉS NÉPALAIS

II. — POLYMORPHISME DES CASÉINES « α_s -MINEURES » ;
LE LOCUS α_{s2} -Cn EST-IL LIÉ AUX LOCI α_{s1} -Cn, β -Cn ET κ -Cn ?

F. GROSCLAUDE, Marie-Françoise MAHÉ, J. C. MERCIER *,
J. BONNEMAIRE ** et J. H. TEISSIER **

Laboratoire de Génétique biochimique,

* *Laboratoire de Recherches sur les Protéines,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy-en-Josas (France)*

** *Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zootechnie,
École nationale supérieure des Sciences agronomiques appliquées
26, boulevard du Docteur-Petitjean
21000 Dijon (France)*

RÉSUMÉ

Un polymorphisme des caséines α_{s2} (caséines « α_s mineures ») a été découvert chez les bovins népalais dont les lactoprotéines ont déjà fait l'objet d'une étude précédente (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). On peut rendre compte des caractéristiques de ce polymorphisme, qui comporte 6 phénotypes différents, en supposant l'existence de 3 variants : le variant classique, α_{s2} -CnA, seul connu jusqu'ici dans le genre *Bos*, le variant α_{s2} -CnB, présent chez les bovins et les zébus locaux, avec une fréquence de l'ordre de 0,34 chez ces derniers, et le variant α_{s2} -CnC, qui paraît propre aux yaks, et dont la fréquence est de 0,23 dans le groupe étudié.

La fraction correspondant à la bande électrophorétique lente et intense du variant α_{s2} -CnC a été purifiée; sa composition en acides aminés est très voisine de celle du variant de référence α_{s2} -CnA, dont elle a la séquence N-terminale; par contre, sa teneur en phosphore est plus faible que celle de la fraction la plus lente (bande α_{s2} -CnA).

Les allèles α_{s2} -CnB et α_{s2} -CnC ne paraissent pas être transmis indépendamment des allèles du locus α_{s1} -Cn. Le locus α_{s2} -Cn pourrait donc être lié à l'unité génétique formée par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn.

INTRODUCTION

La plupart des nombreux travaux consacrés aux caséines bovines ont porté sur les 3 espèces prédominantes, les caséines α_{s1} , β et κ , dont la structure primaire

est désormais connue (MERCIER *et al.*, 1971; RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972; MERCIER *et al.*, 1973), et dont l'analyse du polymorphisme génétique a permis de montrer qu'elles étaient synthétisées par un groupe de trois loci étroitement liés (voir analyse bibliographique dans GROSCLAUDE *et al.*, 1972 *b* et GROSCLAUDE, 1974).

A côté de ces trois espèces, dites « majeures », existent plusieurs espèces « mineures ». On sait que, parmi ces dernières, les caséines γ , R, S et TS sont seulement des fragments de la caséine β (GORDON *et al.*, 1972). Par contre, le groupe des caséines dites « α_s -mineures » qui sont pourtant nettement plus abondantes que les précédentes, est jusqu'ici moins bien connu.

La nomenclature actuellement adoptée pour désigner les fractions de caséines « α_s -mineures », qui s'applique aux bandes séparées par électrophorèse en gel d'amidon avec urée et à pH alcalin, est celle d'ANNAN et MANSON (1969). Ces auteurs appellent α_{s0} la bande plus mobile que la caséine α_{s1} , et désignent par α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s5} les bandes qui migrent entre les caséines α_{s1} et β dans un gel sans mercaptoéthanol; ANNAN et MANSON notent que dans un gel avec mercaptoéthanol la fraction α_{s5} n'existe plus, et que sa disparition est accompagnée d'une augmentation apparente des quantités de caséines α_{s2} , α_{s3} et α_{s4} , avec apparition d'une faible bande, α_{s6} , de mobilité très voisine de celle de la bande α_{s5} . Cette dernière observation a été confirmée par HOAGLAND *et al.* (1971) qui ont montré que l'action du mercaptoéthanol convertit la fraction α_{s5} en fractions α_{s3} et α_{s4} .

La composition en acides aminés de la fraction α_{s0} , établie par MANSON *et al.* (1976), ne se distingue guère de celle de la caséine α_{s1} , dont cette fraction possède par ailleurs les deux résidus C-terminaux, leucine et tryptophane (ANNAN et MANSON, 1969), et les deux résidus N-terminaux, arginine et proline (MANSON *et al.*, 1976). On remarquera aussi que la fraction α_{s0} présente un polymorphisme électrophorétique qui est strictement copié sur celui de la caséine α_{s1} , ce qui tend à confirmer que sa chaîne polypeptidique est bien celle de cette caséine. Par contre les résidus C-terminaux des fractions α_{s3} , α_{s4} et α_{s5} sont la tyrosine et la leucine (RIBADEAU-DUMAS, 1968, 1970; ANNAN et MANSON, 1969; HOAGLAND *et al.*, 1971). D'autre part, HOAGLAND *et al.* (1971) ont trouvé, pour les fractions α_{s3} et α_{s4} , des compositions en acides aminés très voisines, qui sont différentes de celle de la caséine α_{s1} ; ils ont suggéré par ailleurs que la fraction α_{s5} était constituée d'une molécule de type α_{s3} et d'une molécule de type α_{s4} liées par au moins un pont disulfure.

Les travaux récents de BRIGNON *et al.* (1976) indiquent que les fractions α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s6} ont la même composition en acides aminés, une séquence N-terminale identique, les mêmes résidus C-terminaux, et ne diffèrent que par leur teneur en phosphore. Ces caséines sont donc constituées d'une même chaîne polypeptidique qui comporte toutefois, d'une fraction à l'autre, un nombre de groupements phosphate différent. La structure primaire de la chaîne polypeptidique commune à ces fractions vient d'être complètement élucidée (BRIGNON *et al.*, 1977).

Une des raisons qui font que les caséines α_{s2} à α_{s6} ont été peu étudiées réside certainement dans le fait que, contrairement à ce que peuvent laisser supposer les formulations ambiguës de THOMPSON (1970) et de HOAGLAND *et al.* (1971), aucun polymorphisme n'a pu être mis en évidence jusqu'ici au niveau de ces fractions (ASCHAFFENBURG, 1975). Seul MICHALAK (1970) a présenté des électrophorégrammes de laits de 3 vaches polonaises de race Rouge Danoise apparemment dépourvus des

fractions α_{s3} et α_{s4} , et enrichis en caséine α_B , mais l'étude de ces laits n'a pas été poursuivie (MICHALAK, 1974).

Nous décrivons dans ce travail un premier exemple de polymorphisme des caséines α_s -mineures observé chez les bovinés népalais dont le polymorphisme des lactoprotéines a déjà fait l'objet d'une première publication (GROSCLAUDE *et al.*, 1976).

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Origine des échantillons

Les échantillons de caséine sont les mêmes que dans notre étude précédente (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). Ils ont été préparés, rappelons-le, à partir d'échantillons de lait prélevés, dans une haute vallée népalaise, sur des bovinés de divers types génétiques : 42 yaks (*Bos poëphagus*), 7 bovins (*Bos taurus*), 55 hybrides F 1 de type ♂ Yak × ♀ Zébu (*Bos indicus*), 17 hybrides F 1 de type ♂ Bovin × ♀ Yak, 15 hybrides F 1 de type ♂ (Bovin × Zébu) × ♀ Yak, et 20 divers autres hybrides.

Techniques d'électrophorèse

Les techniques d'électrophorèse couramment utilisées ont été référencées dans notre travail précédent (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). En outre, pour tenter de mieux séparer les caséines « α_s -mineures » de la caséine α_{s1} , des électrophorèses en gel d'amidon avec urée (7 M) et 2-mercapto-éthanol ont été effectuées en utilisant les systèmes de tampons suivants : Tris-EDTA, borate, pH 9,2 d'ARONSSON et GRÖNWALL (1957); véronal, pH 8,6, d'ASCHAFFENBURG (1964); citrate-phosphate, pH 7,15, d'ASCHAFFENBURG (1961); Tris-maléate, pH 7,2 de GOMORI (1955); histidine-citrate, pH 6,5, d'ANDERSON et GIBLETT (1975); citrate, pH 6,3, de BAILEY et KIDDY (1972).

Autres techniques

Les caséines « α_s -mineures » ont été préparées, à partir de la caséine entière, en appliquant successivement la technique de ZITTE et CUSTER (1963) pour isoler le complexe α_s et celle de THOMPSON et KIDDY (1964) pour en éliminer la caséine α_{s1} . Le phosphore a été dosé par la technique de BAMANN *et al.* (1948). Les autres techniques ont été décrites précédemment (GROSCLAUDE *et al.*, 1976).

Nomenclature des caséines α_{s2} à α_{s6}

La nomenclature des bandes électrophorétiques de migration plus anodique que la caséine β à pH alcalin, et classées comme « caséines α_s » est celle d'ANNAN et MANSON (1969), qui a été définie à partir d'une caséine entière homozygote pour le variant α_{s1} -CnB. En accord avec ces auteurs (ANNAN et MANSON, 1976), la chaîne polypeptidique commune aux fractions α_{s2} à α_{s6} , sera désignée par α_{s2} , ces fractions par caséine (s) α_{s2} , et le locus de structure correspondant par α_{s2} -Cn.

RÉSULTATS

I. — *Mise en évidence et répartition des variants de caséine α_{s2}*

L'examen des électrophorégrammes donnés, à pH 8,6, par les 156 échantillons de caséines de bovinés népalais permet de distinguer, au niveau des caséines α_{s2} , 6 phénotypes différents (fig. 1). La répartition de ces phénotypes n'est pas la même chez les yaks et leurs hybrides (tabl. 1) :

— Chez les 42 yaks, seuls les types I, V et VI ont été observés, le type I étant le type classique, seul connu jusqu'à présent dans le genre *Bos*. Les caractéristiques phénotypiques de ce polymorphisme suggèrent qu'il est déterminé par un locus biallélique contrôlant le variant classique, qui sera désormais appelé α_{s2} -CnA, et un variant inconnu jusqu'ici, α_{s2} -CnC. Les types I, V et VI correspondent alors respectivement à l'homozygote pour α_{s2} -CnA, à l'homozygote pour α_{s2} -CnC, et à l'hétérozygote pour ces deux variants. Il a été vérifié qu'on obtient un type VI à partir d'un mélange constitué, à parts égales, d'une caséine de type I et d'une caséine de type V.

Si l'interprétation qui vient d'être donnée est correcte, la fréquence du variant α_{s2} -CnC dans le groupe des 42 yaks est de 0,23. Dans l'hypothèse où ce groupe a une structure conforme à la loi de HARDY-WEINBERG, la répartition des trois types doit être la suivante : I : 25 ; V : 2 ; VI : 15. Ces valeurs théoriques sont très proches des valeurs observées (tabl. 1, ligne 1), ce qui tend à confirmer l'interprétation faite du polymorphisme observé chez les yaks.

— Chez les hybrides, tous les types ont été observés, à l'exception du type V considéré ci-dessus comme étant l'homozygote pour le variant α_{s2} -CnC. En fait, la fréquence de ce variant chez l'ensemble des 87 hybrides F I [55 Yak \times Zébu ; 17 Bovin \times Yak ; 15 (Bovin \times Zébu) \times Yak] est sensiblement la moitié de sa fréquence dans le groupe de yaks purs ; tout se passe donc comme si α_{s2} -CnC n'existait pas, ou était très rare chez les bovins et les zébus.

Par contre, les bovins et les zébus possèdent de toute évidence, un autre variant, α_{s2} -CnB dont l'homozygote doit correspondre au type III, le type II représentant l'hétérozygote pour α_{s2} -CnA et α_{s2} -CnB, et le type IV l'hétérozygote pour α_{s2} -CnB et α_{s2} -CnC. On peut reconstituer les deux types considérés comme hétérozygotes en mélangeant, à parts égales, des caséines des 2 types supposés homozygotes qui leur correspondent.

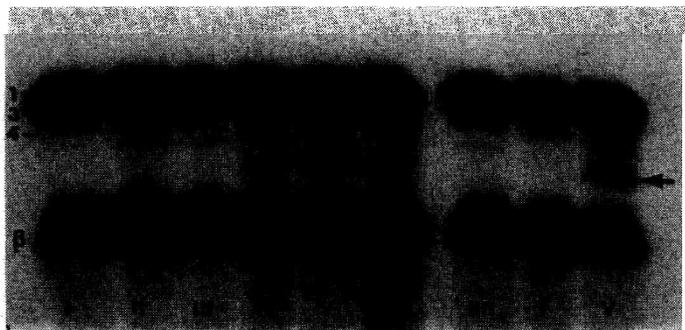


FIG. 1. — Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et 2-mercaptoéthanol (tampon de Wake et Baldwin, 1961) de caséines individuelles représentant les 6 phénotypes de caséine α_{s2} observés chez des bovins népalais ; sens de migration : vers l'anode (ici vers le haut). A droite, les 3 types supposés homozygotes sont représentés une seconde fois côte-à-côte. Génotypes supposés (en notations simplifiées) : I : A/A ; II : A/B ; III : B/B ; IV : B/C ; V : C/C ; VI : A/C. Le phénotype I est le type classique seul reconnu jusqu'ici dans le genre *Bcs*. Sur ce phénotype : 1 : bande α_{s1} (caséine α_{s1}) qui masque les bandes α_{s0} (caséine α_{s1}) et α_{s2} (caséine α_{s2}) ; 3 et 4 : bandes α_{s3} et α_{s4} (caséine α_{s2}) ; la bande α_{s6} (caséine α_{s2}), très faible, n'est pas discernable ici. β : caséine β (nomenclature des fractions α_s selon ANNAN et MANSON, 1969). Flèche : fraction purifiée et analysée au cours de ce travail.

TABLEAU I

Répartition, par type génétique, des phénotypes de caséine α_{s2} observés chez 156 bovinés népalais

Type génétique	Phénotypes des caséines α_{s2} et génotypes supposés (1)						Totaux
	I A/A (1)	II A/B	III B/B	IV B/C	V C/C	VI A/C	
Yak	26				3	13	42
Bovin	5	2					7
♂ Yak × ♀ Zébu	26	15	1	3		10	55
♂ Bovin × ♀ Yak	13	1				3	17
♂ (Bovin × Zébu) × ♀ Yak	10	5					15
Divers autres hybrides.....	10	4	1			5	20
Totaux	90	27	2	3	3	31	156

(1) En notation simplifiée; pour A/A, lire; α_{s2} -CnA/ α_{s3} -CnA, etc.

En se basant sur l'intensité relative des bandes et sur le décalage observé entre les bandes du type I et du type III, on est amené à considérer qu' α_{s2} -CnB est un variant plus lent qu' α_{s2} -CnA.

En effet, on peut mesurer le décalage des bandes des variants α_{s2} -CnA et α_{s2} -CnB en prenant comme référence l'écart séparant les bandes α_{s3} et α_{s4} du type I, qui représente, en principe, une différence d'une charge et demie puisque ces fractions ne diffèrent que par un groupement phosphate (BRIGNON *et al.*, 1976); cette estimation s'appuie sur l'exemple fourni par les variants β -CnB et β -CnC qui diffèrent également par un groupement phosphate, et dont l'écart, dans les mêmes conditions d'électrophorèse, correspond bien à une charge et demie (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a).

Or, dans l'hypothèse où α_{s2} -CnB est plus lent qu' α_{s2} -CnA, la bande lente du type III est α_{s4} , et la bande adjacente plus anodique, α_{s3} . On voit alors que le décalage vers la cathode de la bande α_{s3} du type III par rapport à son homologue du type I correspond sensiblement à une charge, ce qui est la différence la plus simple — et la plus courante — qui puisse exister entre deux variants; de plus, les intensités relatives des bandes du type III sont comparables à celles de leurs homologues du type I.

Par contre, dans l'hypothèse où α_{s2} -CnB est plus rapide qu' α_{s2} -CnA, la bande lente du type III est α_{s6} , et la bande adjacente plus anodique, α_{s4} . Dans ce cas, l'écart entre les bandes α_{s4} des types I et III correspond sensiblement à une demi-charge, et l'intensité relative des bandes du type III est différente de celle de leurs homologues du type I, ce qui est particulièrement sensible au niveau de la bande α_{s6} . Cette hypothèse est donc moins vraisemblable que la première.

Compte tenu de la nature et de l'effectif des types génétiques sur lesquels porte cette étude, la fréquence du variant α_{82} -CnB ne peut être estimée ni dans une population, ni dans un groupe bien défini de bovins ou de zébus. On notera toutefois que, chez les 55 sujets de type ♂ Yak \times ♀ Zébu, sa fréquence est de 0,17. Cela situe vers 0,34 l'ordre de grandeur de la fréquence de ce variant chez les zébus locaux, représentés ici, on le voit, par les mères des hybrides F 1.

Notons enfin qu'en gel acide, le variant α_{82} -CnB ne se distingue pas du variant de référence α_{82} -CnA; par contre, les phénotypes comportant le variant α_{82} -CnC (caséines des types IV, V et VI) présentent une bande, absente dans les autres phénotypes, qui migre, vers la cathode, en avant de la caséine α_{81} , à une distance correspondant à peu près à la moitié de l'écart séparant, dans les mêmes conditions, β -CnA¹ d' α_{81} -CnB ou C.

2. — Analyse biochimique de la fraction lente du variant α_{82} -CnC

Si, dans les fractions de la caséine α_{82} , la localisation des groupements phosphate est déterminée par la structure primaire de la chaîne polypeptidique, comme cela paraît bien être le cas dans les autres caséines (MERCIER *et al.*, 1971; MERCIER, 1973; GROSCLAUDE, 1974), tout polymorphisme génétique de ces fractions sera imputable à une altération de cette chaîne polypeptidique, altération due, elle-même, à une mutation de son locus de structure (¹); d'autre part, toutes les fractions d'un même variant comporteront l'altération qui lui est spécifique.

Une étude biochimique préliminaire a été consacrée au seul variant α_{82} -CnC. La fraction correspondant à la bande lente et intense de ce variant (flèche sur la fig. 1) a pu être isolée à partir de l'un des prélèvements d'environ 1 litre effectués sur des yaks, et qui provenait d'un sujet de génotype α_{82} -CnA/ α_{82} -CnC. Environ 2,9 g de caséine α_{82} ont été obtenus, dans un état de pureté satisfaisant, en traitant 27 g de la caséine entière préparée à partir de ce lait comme il est indiqué dans le chapitre « Matériel et méthodes ». La bande lente a été purifiée, à partir de cette caséine α_{82} , grâce à deux chromatographies successives sur colonne de DEAE-cellulose dans les conditions décrites par MERCIER *et al.* (1968). Le rendement final est faible (85 mg pour 1,5 g de caséine α_{82}) et la fraction lente reste encore contaminée, quoique faiblement, par une impureté de mobilité électrophorétique légèrement supérieure.

La composition en acides aminés trouvée pour cette fraction est comparée, ci-dessous, à celle du variant de référence α_{82} -CnA établie par BRIGNON *et al.* (1976) qui est donnée entre parenthèses :

Asx, 18 (18); Thr, 15 (15); Ser, 11 (17); Pro, 13 (10); Glx, 40 (40); Gly, 3 (2); Ala, 8 (8); Val, 14 (14); Met, 4 (4); Ile, 11 (11); Leu, 14 (13); Tyr, 12 (12); Phe, 6 (6); Trp, non déterminé (2); Lys, 24 (24); His, 3 (3); Arg, 6 (6); 1/2 Cys, non déterminé (2).

On constate que la fraction lente du variant α_{82} -CnC a une composition en acides aminés très voisine de celle du variant de référence, dont elle a, par ailleurs, la séquence N-terminale (²) (NH₂-Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val). Les différences les plus significatives portent sur un excès de glycine, et un fort déficit en sérine. Ce

(¹) On ne peut exclure l'éventualité d'un polymorphisme dû à une mutation modifiant la spécificité de la phosphoryl-kinase, mais, dans ce cas, toutes les caséines seraient sans doute affectées, et pas seulement la caséine α_{82} .

(²) Établie à l'aide du séquenceur.

dernier est sûrement en partie, un artefact (destruction anormale de la sérine au cours de l'hydrolyse acide). Toutefois on peut aussi rapprocher ce déficit en sérine du fait que le dosage du phosphore donne, pour cette fraction, une valeur de 8, qui est inférieure à la teneur de la fraction la moins riche du variant de référence (10 selon BRIGNON *et al.*, 1976, pour la fraction α_{86}). Le variant α_{82} -CnC pourrait ainsi différer du variant α_{82} -CnA par une substitution SerP \rightarrow Gly, la disparition du résidu phosphoséryle pouvant provoquer, en plus, selon le processus proposé par MERCIER (1973), la déphosphorylation d'un ou plusieurs résidus séryle ou thréonyle voisins. Cette hypothèse devra, bien entendu, être vérifiée.

3. — Association entre les allèles du locus α_{81} -Cn et les allèles du locus contrôlant le polymorphisme des caséines α_{82}

L'absence de renseignements d'ordre généalogique sur les animaux donneurs d'échantillons de lait rend impossible la recherche, par la méthode directe (analyse de ségrégations), d'un éventuel linkage du locus contrôlant le polymorphisme des caséines α_{82} avec les loci α_{81} -Cn, β -Cn et κ -Cn. Toutefois, deux observations intéressantes peuvent être faites :

— Chez les 39 femelles dont le père est du type Bovin ou Bovin \times Zébu [17 δ Bovin \times φ Yak; 7 Bovin; 15 δ (Bovin \times Zébu) \times φ Yak], les 16 sujets ne possédant pas le variant α_{81} -CnC, donc de génotype α_{81} -Cn^B/ α_{81} -Cn^B ou α_{81} -Cn^B/ α_{81} -Cn^E, ont tous le génotype α_{82} -Cn^A/ α_{82} -Cn^A; par contre, parmi les 22 femelles possédant le variant α_{81} -CnC, donc de génotype α_{81} -Cn^C/ α_{81} -Cn^C, α_{81} -Cn^B/ α_{81} -Cn^C ou α_{81} -Cn^C/ α_{81} -Cn^E, 14 ont le génotype α_{82} -Cn^A/ α_{82} -Cn^A, mais 8 sont α_{82} -Cn^A/ α_{82} -Cn^B. La différence entre les proportions 0/16 et 8/14 est statistiquement significative ($P/2 = 0,008$). Les allèles α_{82} -Cn^B et α_{81} -Cn^C paraissent donc être associés.

— Chez les 55 femelles hybrides de type δ Yak \times φ Zébu, aucun des 18 sujets de génotype α_{81} -Cn^C/ α_{81} -Cn^E ne possède le variant α_{82} -Cn^C; dans ces génotypes, on peut considérer que l'allèle α_{81} -Cn^E provient du père Yak (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). Par contre, parmi les 32 sujets de génotype α_{81} -Cn^C/ α_{81} -Cn^C, 10 possèdent le variant α_{82} -Cn^C; dans ce cas, le parent Yak a évidemment transmis l'allèle α_{81} -Cn^C. La différence entre les proportions 0/18 et 10/22 est statistiquement significative ($P/2 = 0,006$). Ainsi, lorsque le parent Yak transmet α_{82} -Cn^C, il le transmet avec α_{81} -Cn^C, et pas avec α_{81} -Cn^E. Les allèles α_{82} -Cn^C et α_{81} -Cn^C paraissent donc être associés.

Ces deux observations tendent à indiquer que le locus contrôlant le polymorphisme des caséines α_{82} est lié au locus α_{81} -Cn, donc à l'unité génétique formée par les loci α_{81} -Cn, β -Cn et κ -Cn.

DISCUSSION

Le polymorphisme des caséines α_{82} décrit dans ce travail est le premier qui ait jamais été découvert dans le genre *Bos*. Si l'on compare les trois types homozygotes, qui correspondent chacun à l'expression de l'un des trois allèles, on constate qu'en passant du type de référence α_{82} -CnA à ses variants, toutes les bandes de caséines « α_{82} -mineures » visibles entre les caséines α_{81} et β voient leur mobilité affectée.

Cependant, même si l'on réduit la concentration des solutions de caséines soumises à l'électrophorèse, la bande α_{s1} masque ici le niveau correspondant à la bande α_{s2} du variant de référence α_{s2} -CnA. Ceci est dû au fait que tous les échantillons comportant α_{s2} -CnB ou α_{s2} -CnC possèdent par ailleurs le variant α_{s1} -CnC, plus lent qu' α_{s1} -CnB. D'autre part, plus on va vers l'anode, plus l'écart entre deux bandes diminue, et plus les différences de mobilité électrophorétique s'apprécient mal.

Les autres techniques d'électrophorèse classiques, telles que celles de PETERSON (1963) ou d'ASCHAFFENBURG et MICHALAK (1968) ne donnent pas de meilleurs résultats, d'autant plus qu'avec ces techniques le variant α_{s2} -CnC n'est pas correctement résolu en bandes. On peut par contre dégager, de la caséine α_{s1} , le groupe des bandes α_{s2} à α_{s6} , en utilisant des tampons de pH voisin de 7, tel le tampon citrate-phosphate d'ASCHAFFENBURG (1961). L'effet d'un tel tampon sur la migration relative de ces bandes est bien visible sur les photographies d'électrophorèse sur papier publiées par ASCHAFFENBURG (1961) et sur les électrophorégrammes obtenus en acétate de cellulose par KIRCHMEIER (1974) (ces auteurs n'ont toutefois pas identifié correctement ces fractions). Malheureusement, nous n'avons réussi à obtenir des résultats satisfaisants qu'avec des échantillons fraîchement lyophilisés, ce qui n'était pas le cas des échantillons de caséine népalais au moment où a été effectuée cette partie de notre étude.

En fait, dans un système comme celui de la caséine α_{s2} , une mutation du locus de structure peut avoir, selon sa localisation, des répercussions différentes sur le phénotype. En effet, les diverses fractions électrophorétiques de cette caséine ne diffèrent que par leur nombre de groupements phosphate et la fixation de ces derniers est, selon toute vraisemblance contrôlée par la structure primaire de la chaîne polypeptidique, comme dans les autres caséines (MERCIER *et al.*, 1971; MERCIER, 1973; GROSCLAUDE, 1974). Dans ces conditions, si une mutation provoque une modification de charge dans la partie de la chaîne polypeptidique où la localisation des groupements phosphate est la même pour toutes les fractions, elle se traduira en principe, sur le phénotype, par un simple décalage de toutes les bandes; par contre, si la mutation affecte un site responsable de l'hétérogénéité observée dans le nombre et la localisation des groupements phosphate des diverses fractions — cause, précisément, de l'existence de ces fractions — on pourra observer une modification du nombre, de la mobilité relative, et de l'intensité relative des bandes électrophorétiques. Il semble bien que le variant α_{s2} -CnC, dont l'aspect est très différent de celui du variant de référence α_{s2} -CnA, puisse correspondre à cette dernière situation, hypothèse compatible avec le résultat du dosage de phosphore effectué sur sa bande lente, qui donne une teneur inférieure à celle de la bande lente du variant de référence (bande α_{s6}). Par contre, le variant α_{s2} -CnB correspond vraisemblablement à la première situation. On notera que si α_{s2} -CnB est effectivement un variant plus lent qu' α_{s2} -CnA, la bande de mobilité un peu plus faible que la bande α_{s1} est la bande α_{s2} , et sa mobilité est bien affectée dans le même sens que celle des bandes α_{s3} et α_{s4} (fig. 1, type III à comparer au type I).

Le variant α_{s2} -CnB, présent chez les bovins et les zébus touchés par cette étude, n'a été trouvé chez aucun des 42 yaks dont les lactoprotéines ont été examinées, mais une observation faite sur un hybride ne permet pas d'exclure la présence de ce variant chez *Bos poëphagus*. Toutefois, la conduite du troupeau local n'empêche pas

entièrement les migrations géniques d'une espèce à l'autre (GROSCLAUDE *et al.*, 1976) et c'est plutôt le fait qu'une seule exception ait été trouvée qui est remarquable. Le variant α_{s2} -CnB pourrait donc bien être propre aux bovins et aux zébus, et le variant α_{s2} -CnC spécifique du Yak. En tout état de cause, ces variants contribuent, à côté des variants β -LgD_{Yak} et α_{s1} -CnE, à différencier *Bos poëphagus* de *Bos taurus* et *Bos indicus*.

Le résultat le plus important de cette étude nous paraît être celui qui suggère que le locus contrôlant le polymorphisme des caséines α_{s2} est lié à l'unité génétique formée par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn. Les observations faites dans ce domaine sur chacun des deux variants, α_{s2} -CnB et α_{s2} -CnC, peuvent sembler fragiles, car elles portent sur de petits effectifs et sur les allèles transmis par les mâles, dont le nombre peut être faible, ce qui risque d'introduire des biais non négligeables. Toutefois l'hypothèse de l'existence d'un linkage entre le locus α_{s2} -Cn et le groupe α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cn voit sa vraisemblance renforcée par le fait que les résultats obtenus indépendamment sur les deux variants concordent parfaitement.

NOTE. — Un quatrième variant de caséine α_{s2} , α_{s2} -CnD, a été découvert plus récemment dans deux races bovines de l'est de la France (Vosgienne et Montbéliarde). Les premiers résultats d'une étude en cours révèlent que ce polymorphisme est contrôlé par un locus étroitement lié au groupe α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cn, ce qui confirme pleinement les conclusions du présent travail.

Reçu pour publication en novembre 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr ANNAN et le Dr MANSON d'avoir bien voulu nous donner leur avis sur le problème de la nomenclature des caséines α_{s2} et relire notre manuscrit.

SUMMARY

LACTOPROTEIN POLYMORPHISM IN NEPALESE BOVINAE

II. — POLYMORPHISM OF « MINOR α_s -CASEINS »; IS LOCUS α_{s2} -Cn LINKED TO LOCI α_{s1} -Cn, β -Cn AND κ -Cn ?

A polymorphism of the α_{s2} -caseins (« minor α_s -caseins ») has been discovered in the Nepalese bovine whose lactoproteins have already been studied in a preceding paper (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). One can account for the characteristics of this polymorphism, which involves 6 different phenotypes, by supposing the existence of 3 variants: the classical variant, α_{s2} -CnA, the only one known until now in the genus *Bos*, the variant α_{s2} -CnB, present in indigenous bovine and zebu, with a frequency of about 0,34 in the latter, and the variant α_{s2} -CnC, that seems to be specific to the yaks, and whose frequency is 0,23 in the studied group.

The fraction corresponding to the slow and dense electrophoretic band of variant α_{s2} -CnC has been purified; its amino acid composition is very close to that of the reference variant α_{s2} -CnA, of which it possesses the N-terminal sequence; however, its phosphorus content is lower than that of the slowest fraction (band α_{s6}) of α_{s2} -CnA.

The alleles α_{s2} -CnB and α_{s2} -CnC seem not to be independent of the alleles of locus α_{s1} -Cn. The locus α_{s2} -Cn could thus be linked to the genetic unit formed by the loci α_{s1} -Cn, β -Cn and κ -Cn.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON J. E., GIBLETT E. R., 1975. Intraspecific red cell enzyme variation in the Pigtailed Macaque (*Macaca nemestrina*). *Biochem. Genetics*, **13**, 189-212.
- ANNAN W. D., MANSON W., 1969. A fractionation of the α_2 -casein complex of bovine milk. *J. Dairy Res.*, **36**, 259-268.
- ANNAN W. D., MANSON W., 1976 (Communication personnelle).
- ARONSON T., GRÖNWALL A., 1957. Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis - a new electrophoresis buffer. *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, **9**, 338-341.
- ASCHAFFENBURG R., 1961. Inherited casein variants in cow's milk. *Nature*, **192**, 431-432.
- ASCHAFFENBURG R., 1964. Protein phenotyping by direct polyacrylamide-gel electrophoresis of whole milk. *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 188-191.
- ASCHAFFENBURG R., 1975. (Communication personnelle.)
- ASCHAFFENBURG R., MICHALAK W., 1968. Simultaneous phenotyping procedure for milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1849.
- BAILLY L. F., KIDDY C. A., 1972. Resolution of cattle transferrin in starch gel at pH 6,3. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **3**, 245-247.
- BAMANN E., NOWOTNY E., ROHR L., 1948. Zur colorimetrischen Bestimmung der Phosphorsäure (Einfluss der Säurekonzentration auf die Reduktion der Phosphormolybdänsäure durch Aminonaphthosulfonsäure). *Chem. Ber.*, **81**, 438-441.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J. C., 1976. Premiers éléments de structure primaire des caséines α_{38} bovines. *FEBS Lett.*, **71**, 111-116.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J. C., PELISSIER J. P., DAS B.C., 1977. Séquence complète de la caséine α_{38} . *FEBS Lett.* (soumis pour publication).
- GOMORI G., 1955. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, **1**, 136-146, Academic Press, New York.
- GORDON W. G., GROVES M. L., GREENBERG R., JONES S. B., KALAN E. B., PETERSON R. F., TOWNEND R. E., 1972. Probable identification of γ -, TS-, R- and S-caseins as fragments of β -casein. *J. Dairy Sci.*, **55**, 261-263.
- GROSCLAUDE F., 1974. *Analyse génétique et biochimique du polymorphisme électrophorétique des caséines α_{31} , β et κ chez les bovins (Bos taurus) et les zébus (Bos indicus)*. Thèse de doctorat d'État ès-Sciences, Paris.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., BONNEMAIRE J., TRISSIER J. H., 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovinés népalais. I. Mise en évidence, chez le Yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants : β -Lg D γ_{Yak} et α_{31} -CnE. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **8**, 461-479.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 a. Caractérisation des variants génétiques des caséines α_{31} et β . *Eur. J. Biochem.*, **26**, 328-337.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 b. Genetic aspects of cattle casein research. *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 328-340.
- HOAGLAND P. D., THOMPSON M. P., KALAN E. B., 1971. Amino acid composition of α_{38} -, α_{34} -, α_{58} -caseins. *J. Dairy Sci.*, **54**, 1103-1110.
- KIRCHMEIER O., 1975. Transparenz, elektrophoretischer Analyseergebnisse bei Anwendung verschiedener Methoden. Untersuchungen an Casein. *Z. Lebensm. Unters. - Forsch.*, **157**, 189-252.
- MANSON W., ANNAN W. D., BARNES G. K., 1976. α_{30} -Casein: its preparation and characterisation. *J. Dairy Res.*, **43**, 133-136.
- MERCIER J. C., 1973. *Détermination de la structure primaire des caséines α_{31} et κ bovines. Incidences scientifiques et technologiques*. Thèse de doctorat d'État ès-Sciences, Paris.
- MERCIER J. C., BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Structure primaire de la caséine κ B bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222-235.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine α_{31} bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41-51.
- MERCIER J. C., MAUBOIS J. L., POZNANSKI S., RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie, sur DEAE-cellulose, en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 521-530.
- MICHALAK W., 1967. Anomalous electrophoretic pattern of milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **50**, 1319-1320.
- MICHALAK W., 1974. (Communication personnelle.)
- PETERSON R. F., 1963. High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, **45**, 1136-1139.
- RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Simultaneous determination of α_{31} -, β -, and κ -caseins in whole casein by using carboxypeptidase A. *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 274-281.
- RIBADEAU-DUMAS B., 1970. *Éléments de structure des micelles de caséine; proposition d'un modèle*. Thèse de doctorat d'État ès-Sciences, Orsay.

- RIBADEAU-DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., 1972. Structure primaire de la caséine β bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 504-514.
- THOMPSON M. P., 1970. α_2 and β caseins. In « Milk Proteins », chemistry and molecular biology, **2**, 117-173. H. A. McKenzie Editeur, Academic Press, New York and London.
- THOMPSON M. P., KIDDY C. A., 1964. Genetic polymorphism in caseins of cow's milk. III. Isolation and properties of α_{21} -caseins A, B, and C. *J. Dairy Sci.*, **47**, 626-632.
- WAKE R. G., BALDWIN R. L., 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim biophys. Acta*, **47**, 225-239.
- ZITTE C. A., CUSTER J. H., 1963. Purification and some of the properties of α_2 -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183-1188.

I. N. R. A. - C. N. R. Z.
Département
de
Génétique Animale
78 - JOUY-en-JOSAS (France)