

Polymorphisme de la caséine α_{s2} des Bovinés : caractérisation du variant C du Yak (*Bos grunniens*)

Marie-Françoise MAHÉ⁽¹⁾ et F. GROSCLAUDE

I.N.R.A., Laboratoire de Génétique biochimique, Centre de Recherches zootechniques
F 78350 Jouy-en-Josas

Résumé

Les différences observables, après électrophorèse en gel à pH alcalin, entre le variant α_{s2} -Cn C du Yak (*Bos grunniens*) et le variant de référence de la caséine α_{s2} dans le genre *Bos*, α_{s2} -Cn A, sont dues aux effets de deux substitutions d'acides aminés : 33 Glu (α_{s2} -Cn A) \rightarrow Gly (α_{s2} -Cn C) et 130 Thr (α_{s2} -Cn A) \rightarrow Ile (α_{s2} -Cn C). Cette dernière substitution modifie apparemment les conditions d'estérification des résidus séryle 129 et 131 voisins : en effet, dans le variant α_{s2} -Cn A, seul le résidu 129 paraît être partiellement phosphorylé ; par contre, dans le variant α_{s2} -Cn C, les résidus 129 et 131 se trouvent tous deux phosphorylés dans la fraction rapide, et non phosphorylés dans la fraction lente.

Une troisième substitution, qui n'a pas d'effet sur la charge nette de la protéine, 47 Ala (α_{s2} -Cn A) \rightarrow Thr (α_{s2} -Cn C), a été mise en évidence ; elle n'est pas nécessairement spécifique du variant α_{s2} -Cn C.

Cet exemple apporte des informations complémentaires sur les modalités de phosphorylation des caséines et montre comment, dans certaines conditions, une mutation du locus de structure de la chaîne protéique d'une hétéroprotéine peut modifier le motif électrophorétique de cette dernière.

I. Introduction

La caséine α_{s2} a longtemps été considérée à tort, comme une « caséine mineure », par opposition aux trois caséines majeures, les caséines α_{s1} , β et κ . En fait, sa proportion relative, dans le lait de vache, n'est pas très différente de celle de la caséine κ (11 p. 100 contre 13 p. 100 selon DAVIES & LAW, 1977). Par ailleurs, elle n'est pas, dans toutes les espèces, la moins abondante des 4 caséines. C'est ainsi que le lait de chèvre contient en moyenne environ 50 p. 100 de caséine β et 25 p. 100 de caséine α_{s2} , pour 20 p. 100 de caséine κ et seulement 5 p. 100 de caséine α_{s1} (BOULANGER, 1976).

La relative disgrâce en laquelle a été tenue la caséine α_{s2} par les chercheurs spécialistes des lactoprotéines s'explique certainement par la difficulté de purification,

(1) Ce travail fait partie d'une Thèse de Doctorat d'Université soutenue en 1981 à l'Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, par Marie-Françoise MAHÉ.

donc d'analyse, de ses fractions, identifiables par électrophorèse, et par le fait qu'aucun polymorphisme génétique n'ait été observé pendant longtemps au niveau de ces fractions, ce qui interdisait d'entreprendre l'étude de leur déterminisme génétique.

En fait, le premier exemple d'un polymorphisme génétique de la caséine α_{s2} a été découvert par notre équipe (GROSCLAUDE *et al.*, 1976) dans des laits de bovins népalais, yaks et hybrides divers entre yaks et bovins ou zébus. A côté du type de référence, α_{s2} -Cn A, deux variants ont été identifiés chez ces animaux : un variant α_{s2} -Cn B, paraissant propre aux bovins et aux zébus, et un variant α_{s2} -Cn C, paraissant spécifique du Yak. Ces deux variants ont été retrouvés, en 1976, chez des yaks de République Populaire de Mongolie (GROSCLAUDE *et al.*, 1982).

Un polymorphisme de la caséine α_{s2} a pu être mis en évidence, par la suite, dans deux races voisines de l'est de la France, les races *Vosgienne* et *Montbéliarde*. Ce polymorphisme se caractérise par l'existence, à côté du variant de référence, α_{s2} -Cn A, d'un variant α_{s2} -Cn D, qui diffère d' α_{s2} -Cn A par la délétion d'un élément de séquence de 9 résidus d'acides aminés (GROSCLAUDE *et al.*, 1978). L'identification de ce polymorphisme a permis d'aborder l'étude du déterminisme génétique de la caséine α_{s2} , et il a été montré, dans le même travail, que le locus de structure de cette caséine était étroitement lié au groupe de linkage formé par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn, eux-mêmes étroitement liés (GROSCLAUDE *et al.*, 1972). La séquence des acides aminés de la caséine α_{s2} a par ailleurs été établie par BRIGNON *et al.* (1977) ; la localisation des groupements phosphate dans ses 3 fractions électrophorétiques principales a également fait l'objet d'une étude de BRIGNON (1979).

Le variant α_{s2} -Cn C, découvert chez des yaks népalais, puis retrouvé chez des yaks mongols, présente un motif électrophorétique particulier, différent du motif commun au variant de référence α_{s2} -Cn A (fig. 1), et aux deux autres variants connus, α_{s2} -Cn B et α_{s2} -Cn D. Dans ce variant, les deux bandes principales (R pour la bande rapide et L pour la bande lente), séparées par un fin doublet, sont deux fois plus espacées que 2 des bandes contiguës du variant de référence. Comme il avait été établi par BRIGNON *et al.* (1976) que l'hétérogénéité électrophorétique de la caséine α_{s2} était due à la phosphorylation incomplète de certains résidus séryle ou thréonyle, nous avions suggéré que la mutation spécifique du variant α_{s2} -Cn C affectait un site responsable de cette hétérogénéité (GROSCLAUDE *et al.*, 1976), aussi appelé « site de phosphorylation différentielle ».

Le présent travail rapporte les résultats d'une étude biochimique visant à identifier l'altération, ou les altérations spécifique(s) du variant α_{s2} -Cn C. Nos résultats nous ont par ailleurs conduits à effectuer des recherches complémentaires sur les sites de phosphorylation différentielle de la caséine de référence, α_{s2} -Cn A.

II. Matériel et méthodes

A. Origine des caséines

La caséine α_{s2} -Cn C a été préparée à partir d'un lait d'une femelle yak mongole, homozygote pour les allèles α_{s1} -Cn^C, α_{s2} -Cn^C, β -Cn^{A2}, κ -Cn^A, identifié au cours d'une étude du polymorphisme électrophorétique des lactoprotéines de yaks mongols

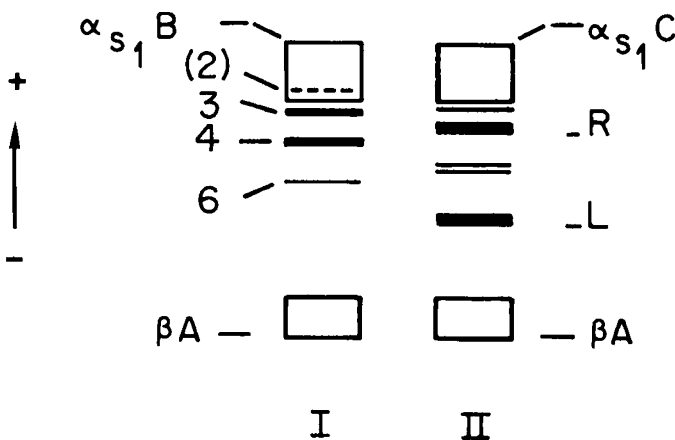


FIG. 1

Représentation schématique des électrophorégrammes (gel d'amidon, pH 8,6) des variants α_{s2} -Cn A (I) et α_{s2} -Cn C (II), dérivée de la figure 1 de GROSCLAUDE et al. (1976). La caséine α_{s1} masque ici la bande 2 du variant α_{s2} -Cn A, représentée en pointillés. Dans le variant α_{s2} -Cn C, la nature de la bande plus rapide que la bande R n'a pas été déterminée.

Diagrammatic picture of the electrophoregrams (starch gel, pH 8,6) of variants α_{s2} -Cn A (I) and α_{s2} -Cn C (II), derived from figure 1 in GROSCLAUDE et al. (1976). Casein α_{s1} here conceals band 2 of variant α_{s2} -Cn A, shown in dotted line. In variant α_{s2} -Cn C, the nature of the band more rapid than band R was not determined.

(GROSCLAUDE *et al.*, 1982) et prélevé à nouveau pour le présent travail (300 ml environ). Malgré les précautions prises, dont l'adjonction de bichromate de potassium (5 ml d'une solution à 1 g/l) ce lait est parvenu coagulé, sans que cela affecte apparemment les caractéristiques électrophorétiques de la caséine α_{s2} . La caséine α_{s2} -Cn A a été préparée à partir d'un lait d'une vache de race Française Frisonne Pie-Noire, homozygote pour les allèles α_{s1} -Cn^B, α_{s2} -Cn^A, β -Cn^{A2} et κ -Cn^B, fraîchement prélevé dans un troupeau proche du Laboratoire.

B. Origine des produits

Les enzymes utilisées proviennent des firmes suivantes : trypsine (2 × cristallisée, TRL, 7 AA), Worthington Biochemical Corporation ; carboxypeptidase A (25 mg/ml), Boehringer ; carboxypeptidase B (400 u/ml), leucine aminopeptidase (100 u/ml), thermolysine (6 000 PU/mg), Merck.

L'origine des autres produits est la suivante : éthanethiol, diméthylbenzylamine, acide trifluoracétique, Pierce ; isothiocyanate de phényle, benzène, acétate d'éthyle, Beckman ; DEAE cellulose microgranulaire DE 32, Whatman ; Dowex AG 50 W X 2, 200-400 mesh, Biorad ; Sephadex, Pharmacia ; bromure de cyanogène (CNBr), Schuchardt.

C. Préparation des caséines entières et des caséines α_{s2}

Les caséines entières ont été préparées, à partir des laits de départ, par la méthode de MERCIER *et al.* (1968). Pour la préparation des caséines α_{s2} à partir des caséines entières, le protocole suivant a été appliqué : la caséine entière a d'abord été traitée selon la technique de THOMPSON & KIDDY (1964), puis selon celle de ZITTLE & CUSTER (1963), ce qui permet d'éliminer l'essentiel des caséines α_{s1} et β . Le mélange restant des caséines α_{s2} et κ a ensuite été chromatographié sur colonne de DEAE cellulose selon MERCIER *et al.* (1968). Dans le cas du variant α_{s2} -Cn C, cette procédure permet d'obtenir les fractions L et R dans un état de pureté satisfaisant. Dans le cas du variant α_{s2} -Cn A, la purification des fractions 2, 3 et 4 doit être parachevée par rechromatographie dans les conditions de MERCIER *et al.* (1968).

D. Hydrolyses enzymatiques

Les conditions générales d'emploi des enzymes ont été décrites dans nos publications antérieures : trypsine (GROSCLAUDE *et al.*, 1970) ; carboxypeptidases A et B, et leucine-aminopeptidase (MERCIER *et al.*, 1970 a) ; thermolysine (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1971). Toutefois, pour les hydrolyses enzymatiques à pH alcalin, le tampon bicarbonate et le tampon Tris-HCl ont été remplacés, en général, par l'acétate de N-éthylmorpholine, 0,1 M, pH 8,6 (HUANG & TANG, 1970). Seules seront précisées dans le texte les conditions particulières d'emploi : quantité de peptide, rapport molaire enzyme/substrat (E/S), température et durée de la réaction. En ce qui concerne les exopeptidases, le volume de la préparation commerciale employé a été rapporté à 0,1 μ mole de peptide, et les résultats ont été exprimés en moles d'acides aminés libérés par mole de peptide.

E. Autres techniques

La S-carboxyméthylation du mélange des peptides CNBr a été effectuée selon WOYCHIK (1965). Le phosphore a été dosé par la technique de BAMANN *et al.* (1948). La spectrométrie de masse a été effectuée à l'aide d'un appareil AEI MS9 selon DAS & LEDERER (1971). Les autres techniques utilisées dans ce travail ont été décrites antérieurement : électrophorèse et chromatographie sur papier, *fingerprints*, chromatographie sur colonnes de DEAE-cellulose, Dowex et Sephadex, dosage des acides aminés (GROSCLAUDE *et al.*, 1970) ; dégradation manuelle d'Edman (MERCIER *et al.*, 1970 a) ; hydrolyse par le bromure de cyanogène (MERCIER *et al.*, 1970 b) ; hydrolyse acide ménagée pour la mise en évidence des phospho-amino acides (MERCIER *et al.*, 1970 c), électrophorèses en gel (GROSCLAUDE *et al.*, 1978).

1. Nomenclature des peptides.

Les règles suivies dans ce domaine ont été définies précédemment (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). Abréviations : CN = bromure de cyanogène ; T = trypsine ; Th = thermolysine.

III. Résultats

A. Etude du variant α_{s2} -Cn C

La figure 1 compare, schématiquement, l'électrophorégramme du variant α_{s2} -Cn C à celui du variant de référence α_{s2} -Cn A. L'étude biochimique du variant α_{s2} -Cn C a porté sur ses deux fractions principales, L et R.

1. Fraction L

Le tableau 1 donne la composition en acides aminés et en phosphore de la fraction L purifiée. Par rapport à la composition de la fraction 4 de la caséine α_{s2} A (BRIGNON *et al.*, 1976) rappelée dans le même tableau, on remarque surtout la teneur plus élevée en glycine, déjà observée, quoique moins accusée (3 résidus dans α_{s2} -Cn C contre 2 dans α_{s2} -Cn A) à l'occasion d'un dosage précédent (GROSCLAUDE *et al.*, 1976) ; par ailleurs, la teneur en phosphore de la fraction L (9 P), quoique supérieure à l'estimation du dosage précédent (8 P), reste toujours inférieure à la valeur trouvée par BRIGNON *et al.* (1976) non seulement pour la bande 4 (11 P), mais même pour la bande la plus lente (bande 6) du variant de référence (10 P).

Pour tenter d'identifier les différences avec plus de précision, une quantité de 550 mg de fraction L a été hydrolysée par CNBr. L'hydrolysate obtenu, d'abord soumis à une S-carboxyméthylation, a ensuite été filtré sur une colonne de Sephadex G50 fine. Le chromatogramme obtenu comportait 4 fractions bien séparées, qui ont été filtrées, pour dessalage, dans une colonne de Sephadex G25 (3 x 60 cm) en acide formique 30 p. 100. L'examen d'une partie aliquote de ces fractions a montré que, dans l'ordre d'élution, et en se référant à la nomenclature de BRIGNON *et al.* (1976) la fraction 1 contenait le peptide CN5, la fraction 2 le peptide CN1, et la fraction 3 les peptides CN2 et CN3, qui ont ensuite été facilement séparés à l'aide d'une colonne de Dowex AG 50 WX2. Le peptide CN4 a été perdu au cours du dessalage. Toutefois, l'identité de la structure de ce térapeptide avec celle du peptide homologue du variant de référence était déjà prouvée, grâce à l'établissement, par dégradation automatique d'Edman, de la séquence des 7 premiers résidus de la fraction L (GROSCLAUDE *et al.*, 1976).

Le tableau 1 donne la composition en acides aminés et phosphore des peptides CNBr de la fraction L, CN1 à CN5. La composition des peptides CN2 et CN3 est identique à celle de leurs homologues du variant α_{s2} -Cn A (BRIGNON *et al.*, 1976). La composition du peptide CN1 est très proche de celle du peptide homologue du variant α_{s2} -Cn A, avec toutefois une valeur un peu inférieure pour la lysine. En fait l'analyse par *finger print* (électrophorèse à pH 1,9, tampon butanol-pyridine-acide acétique-eau) d'un hydrolysate tryptique de CN1 (E/S, 1/50 ; pH 8 ; 2 h) n'a permis de déceler aucune différence, dans le nombre et la mobilité des peptides, avec l'hydrolysate tryptique du peptide CN1 de la caséine de référence α_{s2} A. On retrouve par contre, dans la composition de CN5, la teneur supérieure en glycine et la teneur inférieure en phosphore déjà observées dans la fraction L entière. Ces observations conduisaient à rechercher dans le peptide CN5 l'altération, ou les altérations spécifique(s) du variant α_{s2} -Cn C, au niveau notamment des résidus glycyle et des hydroxyaminoacides.

TABLEAU 1

Composition en acides aminés et phosphore de la fraction L de la caséine α_2C et des peptides CNBr de cette fraction. Les compositions obtenues par BRIGNON et al. (1976) pour le « complexe α_2C » de la caséine de référence α_2A , et pour les peptides CNI et CN5 de cette caséine sont rappelées. La composition du peptide CN4 a été établie par dégradation automatique d'Edman (GROSCLAUDE et al., 1976).

Amino acid and phosphorus composition of the L fraction of α_2C casein, and of the CNBr peptides of this fraction. The values obtained by BRIGNON et al. (1976) for the « α_2C complex » of the reference casein, α_2A , and for the CNI and CN5 peptides of this casein are recalled.

The composition of the peptide CN4 was established by automatic Edman degradation (GROSCLAUDE et al., 1976).

Résidus d'acides aminés	Caséine α_2C		Peptides CNBr de la caséine α_2C (Fraction L pour α_2C ; complexe α_2C pour α_2A) (a)					CN5 α_2A
	α_2C (Fraction L)	α_2A (Fraction 4) (a)	α_2C	CNI α_2A	CN2 α_2C	CN3 α_2C	CN4 α_2C	
Asx	18,32	18,40 (18)	2,87	2,20 (2)	1,14 (1)	0,96 (1)	(1)	13,14
Thr	13,50	14,92 (15)	3,60	4,51 (5)	0,95 (1)		(1)	7,30
Ser	16,10	13,89 (17)	2,47	1,37 (2)	4,40 (5)			9,26
Glx (b)	39,46	40,39 (40)	10,24	10,46 (10)	7,71 (7)			20,69
Pro	10,69	9,96 (10)	2,24	1,14 (1)				6,08
Gly	4,81	2,40 (2)						3,46
Ala	8,07	8,15 (8)	2,04	1,90 (2)				5,55
Cys 1/2	(d)	(2)						(d)
Val	13,80	13,71 (14)	2,11	2,01 (2)	1,00 (1)	1,77 (2)	(1)	8,68
Met (c)	3,49	3,54 (4)						
Ile	11,23	10,31 (11)	1,25	1,06 (1)	1,80 (2)	1,79 (2)		5,71
Leu	14,90	13,59 (13)	5,07	5,00 (5)		1,08 (1)		7,83
Tyr	10,16	12,14 (12)	2,20	2,44 (3)	0,69 (1)	1,63 (2)		5,02
Phe	7,03	6,31 (6)	2,66	2,84 (3)				3,42
His	4,03	3,00 (3)	1,03	0,86 (1)	0,90 (1)			1,51
Lys	21,80	22,85 (24)	8,00	8,81 (9)	1,98 (2)	3,22 (3)	(1)	9,26
Arg	6,00	5,76 (6)	1,98	2,07 (2)		1,09 (1)		3,22
Trp	(e)	(2)				(e)		(e)
P	8,99	11,25 (11)	0,89	(1)	3,89 (3-4)		(4)	4,71
Nombre de résidus	(207)	(207)		(49)	(22)	(17)	(4)	(115)

Les valeurs sont données en moles d'acide aminé ou de phosphore par mole de peptide ; entre parenthèses : valeur exacte. Les compositions de la fraction L et de ses peptides CNBr ont été établies à l'aide de 3 répétitions pour chacun des 3 temps d'hydrolyse habituels (24, 48 et 96 h).

(a) Selon BRIGNON et al. (1976). (b) Glx + homoserine dans les peptides CNBr. (c) Présence d'homoserine lactone dans les peptides CNBr. (d) Les 2 cystéines ont été dosées dans le peptide CN5T6b. (e) Non dosé, mais révélé par coloration spécifique d'Erlich dans les peptides CNBr.

The values are given in moles of amino acid or phosphorus per mole of peptide; between brackets: integral values. The compositions of fraction L and of its CNBr peptides were established from 3 replicates for each of 3 usual hydrolysis times (24, 48 and 96 h).

(a) According to BRIGNON et al. (1976). (b) Glx + homoserine in CNBr peptides. (c) Presence of homoserine lactone in CNBr peptides. (d) The cysteines were determined in peptide CN5T6 b. (e) Not determined, but identified according to the Erlich technique applied to CNBr peptides.

Le peptide CN5 a été soumis à une hydrolyse trypsique (3 μ Moles ; E/S : 1/50 ; 2 h 30 ; 37 °C), et l'hydrolysate ainsi obtenu a été chromatographié sur colonne de Dowex AG 50 WX2. Compte tenu des indications obtenues auparavant, et d'après la séquence de la caséine de référence (fig. 2, selon BRIGNON *et al.*, 1977) les recherches se sont orientées en priorité vers les peptides correspondant aux éléments de séquence 27 à 32, 33 à 41, 46 à 70 et 126 à 136. Ces peptides ont été retrouvés dans les fractions T1, T5, T6 et T7 (tableau 2) :

— Fraction T1. Cette fraction contient le peptide CN5T1, homologue du peptide CN5T1 de la caséine de référence. Ce peptide, qui paraissait toutefois comporter un résidu alanyle en moins, et un résidu thréonyle en plus que le peptide de référence, a été hydrolysé par la thermolysine (1,5 μ Moles ; E/S : 1/50 ; 2 h ; 40 °C). Les quatre peptides obtenus dans cet hydrolysate ont été séparés par électrophorèse sur papier à pH 1,9. L'un d'entre eux, CN5T1Th2 (deuxième par ordre de mobilité croissante vers la cathode, coloré en jaune par le réactif à la ninhydrine), a donné la composition suivante : Asx, 2,04 (2) ; Thr, 0,92 (1) ; Ser, 0,90 (1) ; Glx, 2,81 (3) ; Tyr, 0,97 (1). Ce peptide, qui ne peut correspondre qu'à l'élément de séquence 46 à 53, diffère donc bien de son homologue du variant de référence α_{s2} -Cn A par une substitution 47 Ala \rightarrow Thr (fig. 2). Toutefois, l'hydrolyse acide ménagée indiquant l'absence de phosphothréonine dans CN5T1, cette substitution n'a pas d'effet sur la charge nette de la protéine, et n'appartient donc pas à la classe des altérations recherchées.

— Fraction T5. Cette fraction contient un mélange de peptides, difficiles à séparer ; sa composition suggère qu'il s'agit des peptides homologues de CN5T2 (résidus 126 à 136) et CN5T6 (115 à 125). Cette hypothèse a été confirmée par une analyse au spectromètre de masse qui a permis d'identifier, dans la fraction T5, les 2 séquences N-terminales suivantes : Glu-Gln-Leu-Ser et Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr qui sont celles des peptides CN5T2 et CN5T6 de la caséine α_{s2} A. Il apparaît toutefois que le résidu séryle 129, qui est phosphorylé dans α_{s2} A, ne l'est pas dans la fraction L. En fait, une hydrolyse ménagée de la fraction T5, suivie d'une électrophorèse sur papier, révèle l'absence complète, dans T5, de phospho-aminoacides. Le résidu séryle 130, lui non plus, n'est donc pas phosphorylé dans la fraction L.

Les composants du mélange T5 ont été purifiés, en petites quantités, par électrophorèse préparative sur papier (pH 6,5 ; 3 000 V ; 30 min.). La composition en acides aminés des peptides obtenus, CN5T5a et CN5T6b (tabl. 2) est bien identique à celle des peptides CN5T2 et CN5T6 du variant α_{s2} -Cn A (BRIGNON, 1979) avec toutefois, dans le peptide CN5T5b, la présence d'un résidu isoleucyle au lieu d'un résidu thréonyle.

Pour vérifier la structure de CN5T5b, le reliquat de la fraction T5 a été hydrolysé par la thermolysine (5 μ Moles ; E/S : 1/200 ; 1 h ; 37 °C). L'hydrolysate obtenu a été filtré dans une colonne de Sephadex G 10, en acide acétique 30 p. 100. La seconde fraction de l'éluat a fourni le peptide CN5T5Th2 dont la séquence des acides aminés a été établie par dégradation manuelle d'Edman pour les 5 premiers résidus, et à l'aide des carboxypeptidases A et B pour les 2 derniers. Cette analyse confirme que dans le peptide CN5T5b le résidu 130 est un résidu isoleucyle.

— Fraction T6. Après une purification par électrophorèse sur papier à pH 1,9, cette fraction a fourni le peptide CN5T6b qui, en raison notamment de la présence de cystéine, ne peut correspondre qu'à l'élément de séquence 33-41. Toutefois, ce peptide diffère de son homologue de la caséine α_{s2} A par une substitution 33 Glu \rightarrow Gly, ce qui est confirmé par les résultats de l'action de la leucine aminopeptidase (5 μ l ; 16 h ; 40 °C ; Moles d'acides aminés libérés par mole de peptide : Gly, 0,48 ; Asn, 0,36 ; Leu, 0,32).

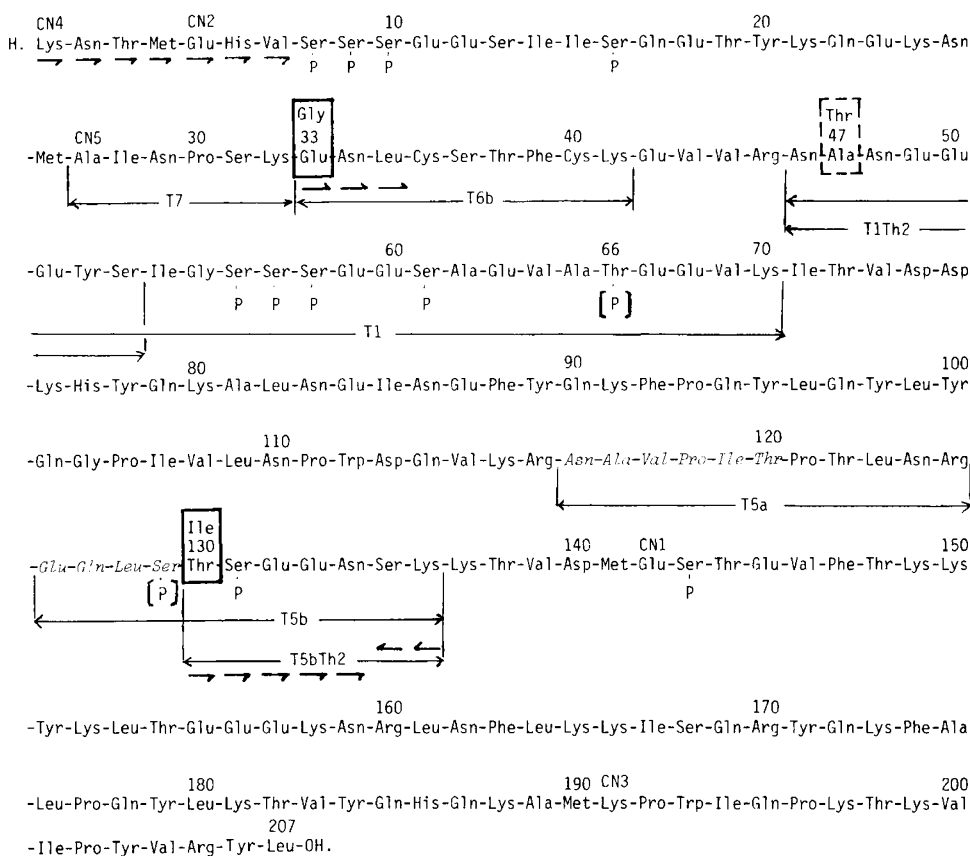


FIG. 2

Localisation des substitutions d'acides aminés différenciant le variant α_{s2} -Cn C du variant de référence α_{s2} -Cn A.

Localisation of the amino acid substitutions that differentiate variant α_{s2} -Cn C from the reference variant α_{s2} -Cn A.

La séquence du variant α_{s2} -Cn A est celle donnée par BRIGNON *et al.* (1977). Entre crochets : sites de phosphorylation différentielle identifiés dans le présent travail. Les deux substitutions affectant la charge nette de la protéine sont encadrées en trait plein, la substitution n'affectant pas cette charge, en tirets. La désignation des peptides CNBr figure au-dessus de leur résidu N-terminal. En italiques, éléments de séquence établis par spectrométrie de masse. \rightarrow , résidus identifiés sur la caséine α_{s2} -C, par la méthode automatique d'Edman (GROSCLAUDE *et al.*, 1976), et sur CN5T5Th2, par la méthode manuelle ; \leftarrow , acide aminé libéré par les carboxypeptidases A ou B ; \Rightarrow , acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase.

The sequence of variant α_{s2} -Cn A is that given by BRIGNON et al. (1977). Between square brackets : sites with incomplete phosphorylation identified in the present work. The two substitutions affecting the net charge of the protein are in continuous boxes, that not affecting the charge in a broken box. Designation of CNBr peptides is written over their N-terminal residue. In italics : elements of sequence established by mass spectrometry. \rightarrow , residues identified, on casein α_{s2} -C, by Edman automatic degradation (GROSCLAUDE et al., 1976) and, on CN5T5Th2, by manual degradation ; \leftarrow , amino acid released by carboxypeptidases A or B ; \Rightarrow , amino acid released by leucine aminopeptidase.

— Fraction T7. Le peptide CN5T7 contenu dans cette fraction a été purifié sur colonne de Sephadex G25 en acide acétique 30 p. 100. L'hydrolyse ménagée de ce peptide, qui correspond à l'élément de séquence 27 à 32 (tabl. 2) indique l'absence de phosphosérine.

En définitive, l'analyse biochimique de la fraction L du variant α_{s_2} -Cn C a conduit à mettre en évidence, par rapport au variant de référence α_{s_2} -Cn A, les substitutions 33 Glu \rightarrow Gly, 47 Ala \rightarrow Thr et 130 Thr \rightarrow Ile (fig. 2). Il a par ailleurs été établi que les résidus sérile 31, 129 et 131 n'étaient pas phosphorylés dans cette fraction.

2. Fraction R

La composition en acides aminés de la fraction R ne diffère pas de manière significative de celle de la fraction L. Par contre le dosage de phosphore a donné la valeur de 10,77, soit 11 groupements phosphate par mole, contre 9 pour la fraction L. Comme cette différence de 2 groupements phosphate peut expliquer la différence de mobilité relative des deux fractions en électrophorèse à pH 8,6, l'analyse de la fraction R s'est orientée vers la recherche de ces 2 groupements, et ceci plus particulièrement dans le peptide CN5.

Les peptides CNBr et les peptides trypsiques du peptide CN5 ont été préparés comme leurs homologues de la fraction L, en partant de 150 mg de fraction R. Les résultats significatifs sont les suivants :

— Si l'on fait abstraction de ce qu'il possède en plus le résidu lysyle 137, le peptide CN5T5 provenant de la fraction R a la même composition en acides aminés que le peptide CN5T5b issu de la fraction L ; il possède en particulier, comme ce dernier, un résidu isoleucyle à la place du résidu thréonyle du variant α_{s_2} -Cn A (tabl. 2). Par ailleurs, la teneur en phosphore de CN5T5 est de 2,27, soit 2 groupements phosphate par mole, alors que CN5T5b n'était pas phosphorylé. D'autre part, l'action conjointe des carboxypeptidases A et B sur CN5T5 (0,05 μ Moles ; pH 8,0 ; 24 h) outre de la lysine, libère de la sérine (0,25 Mole/Mole de peptide) ce qui indique que le résidu sérile 136 n'est pas phosphorylé. Ces résultats permettent de conclure que les résidus sérile 129 et 131 sont phosphorylés dans la fraction R.

— Le peptide CN5T8 provenant de la fraction R a la même composition en acides aminés que son homologue de la fraction L, CN5T6b (tabl. 2) et possède donc en particulier, comme ce dernier, un résidu glycyle à la place du résidu glutamyle du variant α_{s_2} -Cn A.

— La teneur en phosphore de CN5 est de 7,04 P/Mole. Toutefois cette valeur est visiblement une surestimation de la valeur réelle, 6. En effet, l'hydrolyse ménagée de CN5 confirme l'absence de phosphothréonine dans ce peptide. Il n'existe pas, par ailleurs, en dehors des résidus sérile déjà pris en compte (56, 57, 58, 61, 129 et 131) d'autres sites potentiels de phosphorylation. La valeur de 6 concorde avec celle des 11 groupements phosphate trouvés dans la fraction R.

On notera enfin que le peptide CN1 de la fraction R comporte, comme celui de la fraction L, 2 résidus alanyle et 2 résidus thréonyle (valeurs obtenues : Ala, 1,74 ; Thr, 1,84), ce qui confirme l'existence de la substitution 47 Ala (α_{s_2} -Cn A) \rightarrow Thr (α_{s_2} -Cn C).

En définitive les résultats de l'analyse de la fraction R recoupent ceux obtenus pour la fraction L. Par ailleurs la différence de deux groupements phosphate entre ces deux fractions rend bien compte de leur décalage relatif en électrophorèse à pH 8,6.

TABLEAU 2

Composition en acides aminés et phosphore de peptides tryptiques issus des peptides CN5 des fractions L et R de la caséine α_2C .
 Amino acid and phosphorus composition of tryptic peptides of the CN5 peptides of casein α_2C fractions L and R.

résidus d'acides aminés	Fraction L						Fraction R	
	CN5T1	CN5T5	CN5T5 a	CN5T5 b	CNT6b	CN5T7	CN5T5	CN5T8
Asx	2,11 (2)	2,73 (3)	2,00 (2)	1,07 (1)	1,00 (1)	1,17 (1)	1,10 (1)	1,04 (1)
Thr	1,96 (2)	1,80 (2)	1,85 (2)		0,98 (1)			0,93 (1)
Ser	4,07 (5)	2,32 (3)		2,55 (3)	0,98 (1)	0,98 (1)	2,33 (3)	0,93 (1)
Glx	7,77 (8)	3,59 (4)		3,86 (4)			3,92 (4)	
Pro		1,85 (2)	1,93 (2)			1,05 (1)		
Gly	1,03 (1)		0,97 (1)		1,00 (1)			0,93 (1)
Ala	1,85 (2)	1,00 (1)			1,21 (2)	0,98 (1)		1,20 (2)
1/2 Cys			1,00 (1)					
Val	1,96 (2)	1,09 (1)						
Met								
Ile	1,00 (1)	1,73 (2)	1,00 (1)	0,92 (1)		0,96 (1)	0,80 (1)	
Leu		2,09 (2)	1,11 (1)	1,02 (1)	1,00 (1)		0,93 (1)	0,87 (1)
Tyr	1,02 (1)							
Phe					0,71 (1)			0,80 (1)
His								
Lys	0,81 (1)	1,15 (1)	1,00 (1)	1,02 (1)	0,91 (1)	1,11 (1)	1,80 (2)	0,93 (1)
Arg		1,09 (1)						
Trp								
P	3,96 (4)	(11 + 11)	(11)	(11)	(9)	(6)	2,27 (2)	(9)
Nombre de résidus	(25)						(12)	

Les valeurs sont données en moles d'acide aminé ou de phosphore par mole de peptide. Entre parenthèses : valeur entière.
 The values are given in moles of aminoacid or phosphorus per mole of peptide. Between brackets : integral value.

Toutefois, en prenant pour base les conclusions de BRIGNON (1979 ; tabl. 14) sur les sites de phosphorylation du variant α_{s2} -Cn A, nos résultats sur le variant α_{s2} -Cn C ne permettent pas d'expliquer de manière satisfaisante les différences observées entre les électrophorogrammes des deux variants à pH 8,6 : on peut vérifier qu'il devrait exister dans le variant α_{s2} -Cn C, en plus des bandes L et R, une bande plus lente que la caséine β . Or il se trouve que certains aspects des conclusions de BRIGNON (1979) ne sont pas convaincants (phosphorylation du résidu séryle 31 dans les fractions 2 et 4, mais pas dans la fraction 3 ; non indépendance des sites de phosphorylation différentielle Ser 8 et Thr 66). Ces difficultés d'interprétation et ces remarques nous ont conduits à réexaminer le problème des sites de phosphorylation différentielle du variant de référence α_{s2} -Cn A.

B. Recherche des sites de phosphorylation différentielle de la caséine de référence α_{s2} -A

Après purification, les fractions 2, 3 et 4 de la caséine α_{s2} A ont été hydrolysées par CNBr. L'électrophorèse comparative des hydrolysats en gel d'amidon à pH 3, révèle que la différence de charge entre les 3 fractions se situe au niveau du peptide CN5, et, éventuellement, du peptide CN2 qui n'est pas identifiable dans ces conditions d'électrophorèse. Après évaporation, les peptides CNBr ont été repris dans un tampon acide acétique, acide formique (87 ml + 25 ml/l). Dans ces conditions, le peptide CN5 précipite sans contaminant. Le surnageant, contenant les peptides CN1, CN2, CN3 et CN4, a été filtré sur colonne de Sephadex G50 en acide acétique 30 p. 100, ce qui a permis d'obtenir les peptides CN1 et CN4 purifiés ; par contre le mélange des peptides CN2 et CN3 a dû être fractionné par une chromatographie sur colonne de Dowex AG50 WX2, complétée par une électrophorèse sur papier à pH 1,9.

La séquence des acides aminés de la caséine α_{s2} A étant connue (BRIGNON *et al.*, 1977), nous nous limiterons ici aux résultats concernant la localisation des groupes phosphates dans les fractions 2, 3 et 4.

L'hydrolyse acide ménagée des peptides CNBr ne révèle la présence de phosphothréonine que dans le peptide CN5 de la fraction 2, ainsi que — mais à l'état de traces — dans celui de la fraction 3. Par ailleurs l'hydrolyse ménagée indique la présence de phosphosérine dans le peptide CN1 des fractions 2, 3 et 4. Ce peptide comporte donc, dans les 3 fractions, un seul groupement phosphate, puisqu'un seul résidu séryle est susceptible d'être phosphorylé, ce qui confirme les conclusions de BRIGNON *et al.* (1977) et BRIGNON (1979).

Les peptides tryptiques de CN5 ont été séparés sur colonne de Dowex AG50 WX2 et repurifiés par électrophorèse sur papier à pH 1,9. L'hydrolyse ménagée de ces peptides indique l'absence de phospho-aminoacides dans CN5T6 (résidus 27 à 32), mais donne un résultat positif pour les peptides correspondant aux éléments de séquence 46 à 70 (CN5T1 dans les 3 fractions) et 126 à 136 (CN5T2 dans les fractions 2 et 3 ; CN5T4 ainsi que CN5T2, mais en plus faible quantité, dans la fraction 4).

Le tableau 3 donne la teneur en phosphore obtenue pour les peptides CN1, CN2, CN5, CN5T1, CN5T2 et CN5T4. Les conclusions suivantes peuvent alors être tirées de l'ensemble des résultats obtenus :

TABLEAU 3

Composition en phosphore de peptides issus des fractions 2, 3 et 4 de la caséine $\alpha_{s2}A$.

Phosphorus composition of peptides issued from fractions 2, 3 and 4 of casein $\alpha_{s2}A$.

Peptides (résidus)	Fractions de la caséine $\alpha_{s2}A$		
	2	3	4
CN1	(a) (1)	(a) (1)	(a) (1)
CN2	4,17 (4)	4,02 (4)	4,32 (4)
CN5	7,17 (7)	6,55 (6)	6,24 (5)
CN5T1 (46 à 70)	5,19 (5)	4,34 (4)	4,50 (4)
CN5T2	1,80 (2)	2,01 (2)	[1,82 (2)]
ou CN5T4 (126 à 136)	—	—	0,78 (1)
Caséine $\alpha_{s2}A$ CN1 + CN2 + CN5	(12)	(11)	(10)

Les valeurs sont données en moles de phosphore par mole de peptide. Entre parenthèses : valeurs entières.
(a) Mis en évidence par hydrolyse acide ménagée ; il existe un seul site potentiel de phosphorylation.
Entre crochets : dans la fraction 4, le peptide CN5T4 prédomine nettement sur le peptide CN5T2.

The values are given in moles of phosphorus per mole of peptide. Between brackets : integral values.

(a) Demonstrated by mild hydrolysis in acid ; there is only one potential site of phosphorylation.

Between square brackets : in fraction 4, peptide CN5T4 readily predominates over peptide CN5T2.

— par rapport à la fraction 3, la fraction 2 comporte un groupement phosphate supplémentaire, localisé dans CN5T1. Compte tenu de la présence de phosphothréonine dans CN5 et dans ce peptide, ce groupement supplémentaire doit estérifier le résidu thréonyle 66, ce qui confirme les conclusions de BRIGNON (1979) ;

— par rapport à la fraction 3, la fraction 4 possède 1 groupement phosphate en moins et ceci dans la séquence 126 à 136. Le résidu séryle non estérifié dans la fraction 4 ne peut être que le résidu 129 qui est un site de phosphorylation secondaire, par rapport au site primaire qu'est le résidu séryle 131 (MERCIER, 1981). A noter que ces observations faites sur CN5T4 de la fraction 4 ont été confirmées par une analyse similaire de la fraction 4 du variant α_{s2} -Cn D (MAHÉ, 1981).

La présence de traces de phosphothréonine dans la fraction 3, ainsi que celle du peptide CN5T2 dans la fraction 4 peuvent s'expliquer aussi bien par une contamination des fractions 3 et 4 utilisées pour la présente analyse biochimique, que par une hétérogénéité réelle de ces fractions. Dans cette dernière hypothèse, l'estérification du résidu 66 Thr dans une partie des chaînes moléculaires constituant la fraction 3 peut être compensée par la non-estérification du résidu 129 Ser. Par contre pour expliquer l'estérification du résidu 129 Ser dans une partie des chaînes de la fraction 4, il faut supposer la non-estérification d'un autre site qui n'a pas été identifié dans ce travail.

IV. Discussion

L'identification, dans les fractions 2, 3 et 4, des sites de phosphorylation de la caséine α_{s2} A est une recherche délicate, en raison, tout d'abord, de la difficulté d'obtenir ces fractions dans un état de pureté satisfaisant. Par ailleurs, puisqu'il existe au moins deux sites de phosphorylation différentielle dans la caséine α_{s2} , on doit s'attendre à ce qu'une de ses fractions au moins, la fraction 3, soit hétérogène. On ne dispose pas, à notre connaissance, d'une technique permettant de séparer les molécules d'une phosphoprotéine qui ne diffèrent que par la localisation d'un de leurs groupements phosphate. On est donc conduit à identifier les particularités des composants du mélange à partir de ses peptides, mais on n'est plus alors en mesure de vérifier que tous les peptides ainsi isolés dérivent bien de la fraction à étudier et non d'un contaminant provenant d'une autre fraction. A noter aussi que la comparaison des électrophorégrammes de laits individuels indique qu'il existe d'un individu à l'autre, des variations significatives de la proportion relative des fractions de la caséine α_{s2} . Le choix de l'échantillon retenu pour l'analyse biochimique des fractions peut alors avoir une influence sur le développement ultérieur du travail, voire sur certains aspects de ses conclusions (degré de purification des fractions, conclusions d'ordre quantitatif sur la composition des fractions hétérogènes).

Les résultats obtenus dans ce travail sur le variant α_{s2} -Cn C et sur les sites de phosphorylation différentielle du variant de référence α_{s2} -Cn A permettent de rendre compte des particularités électrophorétiques de ces deux variants et de leurs relations. En effet, le décalage vers la cathode de la bande R d' α_{s2} -Cn C par rapport à la bande 3 d' α_{s2} -Cn A s'explique par les effets de la substitution 33 Glu \rightarrow Gly, et le décalage entre les bandes L et R d' α_{s2} -Cn C par la différence de deux groupements phosphate entre les fractions correspondantes. En termes de correspondance entre les fractions du variant α_{s2} -Cn A et celles du variant α_{s2} -Cn C, on peut voir que, sous l'effet de la substitution 130 Thr \rightarrow Ile, une partie des molécules de la fraction 3 d' α_{s2} -Cn A doit se retrouver dans la fraction R d' α_{s2} -Cn C, le reste, ainsi que les molécules de la fraction 4 se retrouvant dans la fraction L.

Les mutations qui sont à l'origine des deux substitutions d'acides aminés qui expliquent la différence de mobilité électrophorétique des variants α_{s2} -Cn A et α_{s2} -Cn C ont pu, *a priori*, survenir soit simultanément, soit successivement. Dans cette dernière hypothèse, on peut imaginer que le variant α_{s2} -Cn B trouvé chez les yaks mongols (GROSCLAUDE *et al.*, 1982) apparemment identique au variant α_{s2} -Cn B découvert à l'origine chez des bovins népalais (GROSCLAUDE *et al.*, 1976), pourrait être le variant intermédiaire entre α_{s2} -Cn A et α_{s2} -Cn C. Dans ce cas, il dériverait du variant α_{s2} -Cn A par la seule substitution 33 Glu \rightarrow Gly, substitution qui pourrait effectivement rendre compte de sa mobilité électrophorétique relative. Malheureusement, l'étude biochimique du variant α_{s2} -Cn B n'a pu être entreprise par manque d'une quantité suffisante de caséine.

La troisième substitution d'acides aminés mise en évidence dans ce travail, 47 Ala (α_{s2} -Cn A) \rightarrow Thr (α_{s2} -Cn C), n'a pas d'effet sur la charge nette de la protéine. Le fait qu'elle ait été trouvée dans un échantillon de caséine α_{s2} C n'implique pas nécessairement qu'elle soit spécifique du variant α_{s2} -Cn C. Elle pourrait aussi correspondre à un polymorphisme de ce variant (la caséine étudiée proviendrait dans ce cas d'un sujet homozygote), être spécifique d'un groupe de variants incluant α_{s2} -Cn C, ou encore être fixée chez le Yak. Rappelons qu'une observation similaire avait déjà

été faite, et discutée, au cours d'une étude sur la caséine κ du Zébu [cf. substitution 135 Ile (κ -Cn A) \rightarrow Thr (κ -Cn B) dans GROSCLAUDE *et al.*, 1974].

MERCIER (1981) a passé en revue, récemment, les conditions de l'incorporation de groupements phosphate dans les caséines. Cette analyse confirme que « tous les résidus phosphoséryle et phosphothréonyle identifiés dans les caséines de différentes espèces sont localisés dans des séquences tripeptidiques anioniques, -Ser/Thr-X-A-, X désignant un résidu d'acide aminé quelconque, et A un résidu acide. Ceci suggère que la phosphorylation des caséines implique la reconnaissance, par une ou plusieurs enzymes, de sites primaires et secondaires correspondant à des triplets d'acides aminés où les déterminants sont respectivement des résidus d'acides aminés dicarboxyliques et des résidus séryle déjà phosphorylés ».

Toutefois, comme le discute également MERCIER (1981), divers facteurs peuvent influencer le taux et la vitesse d'incorporation des groupements phosphate dans les caséines, entre autres « les caractéristiques de l'environnement local tels que la charge électrique, l'hydrophobicité, la structure secondaire et l'encombrement stérique ».

Les résultats du présent travail apportent des éléments d'information sur le rôle joué par cet environnement local. Il apparaît en effet que la nature du résidu 130 de la caséine α_{s2} influence la phosphorylation des résidus 129 et 131 qui l'encadrent. Tout se passe comme si la phosphorylation du résidu séryle 131 était rendue plus difficile par la présence d'une isoleucine en position 130, et comme si, lorsqu'une thréonine occupe cette position, la difficulté de phosphorylation se situait alors au niveau du résidu séryle 129. L'explication à donner à ces observations relève d'une approche biophysique. Toujours peut-on imaginer que dans le cas du variant α_{s2} -Cn A la kinase reconnaît dans le résidu thréonyle 130 un site accepteur, qu'elle ne peut phosphoryler, et que son affinité pour ce site limite l'accessibilité du résidu séryle 129 à une autre molécule de kinase.

Nous avons suggéré précédemment (GROSCLAUDE *et al.*, 1976) que le fait que le variant α_{s2} -Cn C présentait un motif électrophorétique différent de celui du variant de référence α_{s2} -Cn A pouvait s'expliquer par l'hypothèse que la mutation spécifique de ce variant affectait un site de phosphorylation différentielle de la caséine α_{s2} A. Nos résultats confirment la validité de cette hypothèse. L'exemple du variant α_{s2} -Cn C revêt alors un intérêt général pour tous les cas où une hétéroprotéine montre, en électrophorèse, une hétérogénéité due à la non-saturation d'un ou plusieurs sites accepteurs de son groupement prosthétique. Dans tous ces cas, on peut attendre qu'une mutation du locus de structure de la chaîne polypeptidique de cette hétéroprotéine, si elle affecte l'un de ces résidus accepteurs, ou un résidu voisin, puisse provoquer un changement du motif électrophorétique de la protéine. Mais inversement, on peut également imaginer qu'une mutation de ce locus puisse aussi provoquer un changement de ce motif, en créant, là où il n'existe pas, un site incomplètement saturé par le groupement prosthétique.

Reçu pour publication en novembre 1982

Remerciements

Nous sommes reconnaissants à l'Ambassade de la République Populaire de Mongolie à Paris de nous avoir fait parvenir le lait nécessaire à cette étude. Nous remercions M. B.C. DAS pour son aide en matière de spectrométrie de masse.

Summary

Polymorphism of α_{52} casein of Bovinae : characterization of the C variant of the Yak (Bos grunniens)

The differences observed, after gel electrophoresis at alkaline pH, between the α_{52} -Cn C variant of the Yak (*Bos grunniens*) and the reference variant of α_{52} -casein in the genus *Bos*, α_{52} -Cn A, are due to the effects of two amino acid substitutions : 33 Glu (α_{52} -Cn A) \rightarrow Gly (α_{52} -Cn C) and 130 Thr (α_{52} -Cn A) \rightarrow Ile (α_{52} -Cn C). The latter substitution apparently modifies the conditions of esterification of the neighbouring seryle residues 129 and 131 : in variant α_{52} -Cn A, only residue 129 appears to be partially phosphorylated, when, in variant α_{52} -Cn C, both residues 129 and 131 are found phosphorylated in the fast fraction and unphosphorylated in the slow fraction.

A third substitution, which has no effect on the net charge of the protein, 47 Ala (α_{52} -Cn A) \rightarrow Thr (α_{52} -Cn C), was found ; this is not necessarily specific to the α_{52} -Cn C variant.

This example brings complementary information about the mode of phosphorylation of caseins and shows how, in certain conditions, a mutation in the structural locus of the polypeptide chain of a heteroprotein may alter the electrophoretic pattern of this protein.

Références bibliographiques

- BAMANN E., NOVOTNY E., ROHR L., 1948. Zur colorimetrischen Bestimmung der Phosphorsäure (Einfluss der Säurekonzentration auf die Reduktion der Phosphormolybdänsäure durch Amino-naphtosulfonsäure). *Chem. Ber.*, **81**, 438-441.
- BOULANGER A., 1976. *Etude biochimique et génétique des protéines du lait de chèvre (Capra hircus)*. Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Université de Paris VII.
- BRIGNON G., 1979. *Détermination de la structure primaire de la caséine α_{52} bovine. Nouvelles évidences concernant le code de phosphorylation des caséines*. Thèse de Doctorat d'Université, Université Paris VII.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J.-C., 1976. Premiers éléments de structure primaire des caséines α_{52} bovines. *FEBS Lett.*, **71**, 111-116.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J.-C., PELISSIER J.-P., DAS B.-C., 1977. Complete amino acid sequence of bovine α_{52} -casein. *FEBS Lett.*, **76**, 274-279.
- DAS B.-C., LEDERER E., 1971. In new techniques in amino acids, peptide and protein analysis (Niederwieser A et Pataki G., Ed) *Ann. Arbor Science*, 175-225.
- DAVIES D.T., LAW A.J.R., 1977. An improved method for the quantitative fractionation of casein mixtures using ion-exchange chromatography. *J. Dairy Res.*, **44**, 213-221.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.-F., ACCOLAS J.-P., 1982. Note sur le polymorphisme génétique des lactoprotéines de bovins et de yaks mongols. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **14**, 483-488.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.-F., MERCIER J.-C., 1974. Comparaison du polymorphisme génétique des lactoprotéines du Zébu et des bovins. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **6**, 305-329.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M.-F., MERCIER J.-C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J.-H., 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovins népalais. II. - Polymorphisme des caséines « α_5 mineures » ; le locus α_{52} -Cn est-il lié aux loci α_{51} -Cn, β -Cn et κ -Cn ? *Ann. Génét. Sél. anim.*, **8**, 481-491.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1970. Structure primaire de la caséine α_{51} bovine. Localisation des peptides tryptiques dans les fragments obtenus par hydrolyse tryptique de la caséine maléylée. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 98-107.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972. Genetic aspects of cattle casein research. *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 328-340.
- GROSCLAUDE F., JOUDRIER P., MAHÉ M.-F., 1978. Polymorphisme de la caséine α_{52} bovine : étroite liaison du locus α_{52} -Cn avec les loci α_{51} -Cn, β -Cn et κ -Cn ; mise en évidence d'une délétion dans le variant α_{52} -Cn D. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **10**, 313-327.

- HUANG W.Y., TANG J., 1970. Carboxyl-terminal sequence of human Gastricsin and Pepsin. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2189-2193.
- MAHÉ M.-F., 1981. *Analyse biochimique de deux variants de caséine bovine, $\alpha_{s2}C$, $\alpha_{s2}D$* . Thèse de Doctorat d'Université, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay.
- MERCIER J.-C., 1981. Phosphorylation of caseins, present evidence for an aminoacid triplet code posttranslationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, **63**, 1-17.
- 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.
- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 a. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence des 48 résidus d'acides aminés de l'extrémité COOH-terminale. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 108-119.
- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 b. Structure primaire de la caséine α_{s1} . Enchaînement des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène et des peptides résultant de l'hydrolyse trypsique de la caséine α_{s1} maléylée. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 439-446.
- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 c. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence partielle. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 453-460.
- RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., 1971. Structure primaire de la caséine β bovine. Enchaînement des peptides trypsiques et des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène. *Eur. J. Biochem.*, **18**, 252-257.
- THOMPSON M.P., KIDDY C.A., 1964. Genetic polymorphism in casein of cow's milk. III. - Isolation and properties of α_{s1} -caseins A, B and C. *J. Dairy Sci.*, **47**, 626-632.
- ZITTLE C.A., CUSTER J.H., 1963. Purification and some of the properties of α_5 -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183-1188.
- WOYCHIK J.H., 1965. Preparation and properties of reduced κ -casein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 542-547.