

**Polymorphisme de la caséine α_{s2} bovine :
étroite liaison du locus α_{s2} -Cn
avec les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn;
mise en évidence d'une délétion dans le variant α_{s2} -Cn D**

F. GROSCLAUDE, P. JOUDRIER (*) et Marie-Françoise MAHÉ

avec la collaboration technique de G. HAZÉ (*)

Laboratoire de Génétique biochimique,

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

Résumé

Un polymorphisme de la caséine α_{s2} a été mis en évidence, par électrophorèse en gel, dans des laits de bovins de deux races de l'est de la France, les races *Vosgienne* et *Montbéliarde*. L'analyse génétique de ce polymorphisme conclut à l'existence, à côté du type de référence α_{s2} -Cn A, seul observé jusqu'ici dans les races européennes, d'un variant appelé α_{s2} -Cn D, de mobilité électrophorétique nettement plus lente à pH 8,6, et plus rapide à pH 3,0. La fréquence de l'allèle correspondant est de 0,088 dans l'échantillon *Vosgien* (227 vaches) et seulement de 0,011 dans l'échantillon *Montbéliard* (798 vaches).

La caséine α_{s2} a été préparée à partir du lait d'une vache homozygote pour le variant α_{s2} -Cn D. L'étude de la structure primaire de ce variant révèle qu'elle diffère de celle du variant de référence α_{s2} -Cn A (BRIGNON *et al.*, 1977) par la délétion d'un peptide très acide de 9 résidus d'acides aminés, comportant notamment l'une des deux grappes de 3 résidus phosphoséryle présentes dans la caséine α_{s2} , et que l'on retrouve également dans les caséines α_{s1} et β . Compte tenu des particularités de la séquence du variant de référence, il y a ambiguïté sur la localisation exacte de la délétion (résidus 50 à 58, ou 51 à 59, ou 52 à 60).

La mise en évidence de cette délétion confirme que le locus contrôlant le polymorphisme décrit est le locus de structure de la caséine α_{s2} . L'analyse des ségrégations dans la descendance de deux taureaux, hétérozygotes l'un au locus α_{s2} -Cn et aux loci α_{s1} -Cn et κ -Cn, l'autre au locus α_{s2} -Cn et aux loci β -Cn et κ -Cn, indique que le locus α_{s2} -Cn est étroitement lié à l'unité génétique formée par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn. Les quatre espèces de caséines bovines sont donc contrôlées par quatre loci étroitement liés.

Introduction

Après électrophorèse en gel d'amidon avec urée et 2-mercaptoéthanol, et à pH alcalin (tampon de WAKE et BALDWIN, 1961, ou d'ARONSON et GRÖNWALL, 1957), la caséine α_{s2} est représentée — dans la nomenclature d'ANNAN et MANSON

(*) Adresse actuelle : Laboratoire de Technologie des Blés, I.N.R.A., École Nationale Supérieure Agronomique, 9, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex.

(1969) — par les bandes 2, 3, 4 et 6. Ces quatre bandes correspondent en effet à une même chaîne polypeptidique (caséine α_{s2}), et ne diffèrent que par leur degré de phosphorylation (13, 12, 11 et 10 groupements phosphate/mol. respectivement selon BRIGNON *et al.*, 1976). La structure primaire de cette chaîne polypeptidique, qui comporte 207 résidus d'acides aminés, vient d'être complètement élucidée (BRIGNON *et al.*, 1977); toutefois, la position des groupements phosphate non communs aux quatre bandes électrophorétiques n'est pas encore connue avec exactitude.

Alors que le polymorphisme génétique des caséines α_{s1} , β et κ a fait l'objet de nombreux travaux, qui ont notamment permis de montrer que ces caséines étaient synthétisées par 3 loci de structure étroitement liés (voir analyse détaillée dans GROSCLAUDE *et al.*, 1972, et GROSCLAUDE, 1974), le seul exemple de polymorphisme de la caséine α_{s2} est celui qui a été récemment décrit par notre équipe chez des yaks, zébus et bovins népalais (GROSCLAUDE *et al.*, 1976 *b*); dans cette étude, 2 variants, α_{s2} -Cn B et α_{s2} -Cn C, ont été identifiés, en plus du variant de référence, α_{s2} -Cn A, seul observé jusque-là. Le variant α_{s2} -Cn C a été retrouvé par la suite chez des yaks de République Populaire de Mongolie (GROSCLAUDE, 1976) et le variant α_{s2} -Cn B chez des zébus de République Sud-Africaine (GUÉRIN, 1976). L'examen des données collectées au Népal suggérait que le locus contrôlant ce polymorphisme de la caséine α_{s2} était lié à l'unité génétique formée par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn.

Le présent travail rapporte les résultats de l'analyse génétique et biochimique d'un polymorphisme de la caséine α_{s2} qui a été découvert dans deux races de l'est de la France, les races Vosgienne et Montbéliarde, et qui constitue le premier exemple de polymorphisme génétique de cette caséine décrit dans les races ouest-européennes.

Matériel et méthodes

Origine et conditionnement des échantillons

En race *Vosgienne*, les échantillons de lait (30 ml environ) ont été prélevés dans 28 élevages, dont plus de la moitié sont localisés dans la vallée de Munster (Haut-Rhin); ces élevages représentent l'essentiel du noyau de sélection de cette race dont l'effectif résiduel était estimé, en 1975, à 4 000 vaches adultes (MALEGEANT et REPARET, 1975). En race *Montbéliarde*, les échantillons ont d'abord été prélevés, à titre de sondage, dans quatre départements: Doubs (199 échantillons provenant de 12 élevages), Jura (195; 12), Haute-Saône (205; 11) et Ain (199; 14). Une collecte supplémentaire a été ensuite effectuée dans des élevages du Jura et de l'Ain possédant des filles des taureaux retenus pour l'étude génétique.

Ces échantillons ont été prélevés dans des flacons contenant, comme conservateur, une solution aqueuse de bichromate de potassium (1 g/l) à raison de 4 gouttes pour 30 ml de lait, et maintenus autant que possible au frais.

L'analyse de la structure primaire du variant α_{s2} -CnD a été effectuée à partir du lait d'une vache *Vosgienne*, homozygote pour ce variant. Pour ce lait (6 l environ) le toluène (5 ml environ par litre) a été utilisé comme conservateur.

Origine des produits

Les enzymes utilisées proviennent des firmes suivantes : trypsine ($2 \times$ cristallisée, TRI, 7 AA) et phosphatase alcaline (BABC OCB, 10 mg/ml), Worthington Biochemical Corporation; carboxypeptidase A (25 mg/ml), Boehringer; carboxypeptidase B (400 u/ml), Merck.

L'origine des autres produits est la suivante : *n*-propanol, éthanethiol, diméthylbenzylamine, N, O-bis (triméthylsilyl) acétamide (BSA), acide trifluoracétique, Pierce; isothiocyanate de phényle, acide *n*-heptafluorobutyrique, *n*-heptane, benzène, acétate d'éthyle, chlorobutane, Beckman; DEAE cellulose microgranulaire DE 32, Whatman; Dowex AG-50 W $\times 2$, 200-400 mesh, Biorad; Sephadex, Pharmacia; Ultrogel AcA 54, LKB; feuilles plastiques CCM, gel de silice F₂₅₁, Merck; bromure de cyanogène, Schuchardt.

Préparation des caséines entières

La caséine entière a été préparée, à partir du lait destiné à la purification de la caséine α_{s2} D, par la méthode de MERCIER *et al.*, (1968); les échantillons de petit volume ont été traités par la technique plus rapide d'ASCHAFFENBURG et DREWRY (1959). Les caséines ainsi préparées ont été lyophilisées.

Préparation de la caséine α_{s2} D

En suivant le protocole décrit par BRIGNON *et al.* (1976), la caséine α_{s2} D n'a pas le même comportement que la caséine α_{s2} de référence (variant α_{s2} A). On la retrouve en effet, avec la caséine κ et un contaminant de caséine α_{s1} , dans le surnageant obtenu après la première étape, qui est en fait la technique mise au point par ZITTLE et CUSTER (1963) pour préparer la caséine κ . On peut donc en principe, et sans autre étape de fractionnement chimique, chromatographier ce surnageant sur colonne de DEAE-cellulose microgranulaire (BRIGNON *et al.*, 1976) pour en séparer les fractions de la caséine α_{s2} . Toutefois, cette dernière séparation s'avère difficile à réussir avec un bon rendement en raison du chevauchement des différentes fractions.

En procédant à des essais, une autre technique a été définie au cours de ce travail : la caséine entière est dissoute dans l'urée 6,6 M à pH 4,9 et à la température du Laboratoire, puis on amène la solution, par addition d'eau distillée, à une concentration en urée de 3,3 M (THOMPSON et KIDDY, 1964). Dans ces conditions, on observe qu'en partant de caséine de type α_{s2} D, une partie de la fraction correspondant à la bande centrale de caséine α_{s2} (bande 3 sur la figure 1a) se retrouve avec la caséine β dans le surnageant, alors que le reste de cette fraction ainsi que les deux autres fractions principales (bandes 2 et 4 sur la figure 1a) précipitent avec les caséines α_{s1} et κ . On constate alors que les fractions de caséine α_{s2} peuvent être purifiées de manière satisfaisante par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose microgranulaire à partir du précipité.

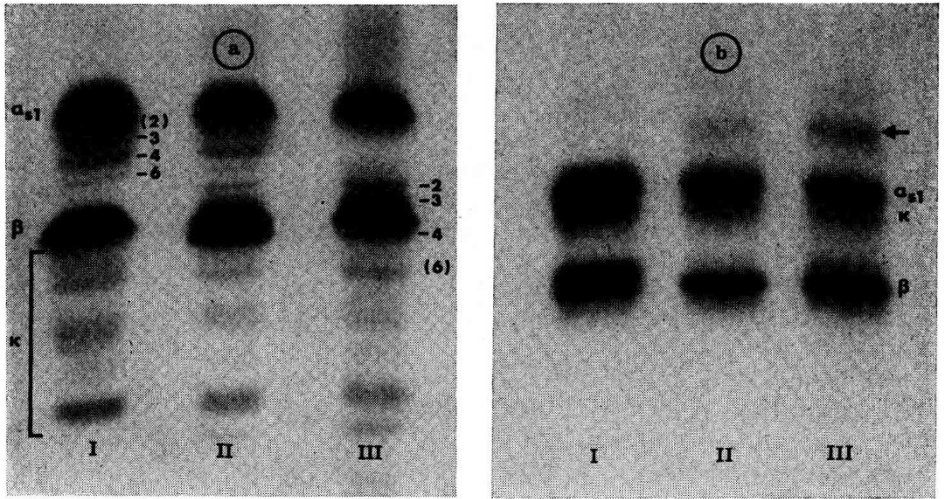


FIG. 1. — *Electrophorèse en gel d'amidon avec urée et 2-mercaptoéthanol de caséines individuelles représentant les 3 phénotypes de caséines α_{s2} observés chez des vaches de race Vosgienne* : I : α_{s2} -Cn A/A; II : α_{s2} -Cn A/D; III : α_{s2} -Cn D/D.

- a) à pH 8,6, avec les tampons de WAKE et BALDWIN (1961). Sens de migration : vers l'anode. La numérotation des bandes sur le type I est celle d'ANNAN et MANSON (1969); la caséine α_{s1} masque la bande 2. La numérotation des bandes supposées homologues dans le variant α_{s2} -Cn D est indiquée sur le type III.
- b) à pH 3,0. Sens de migration : vers la cathode. Le variant α_{s2} D migre plus vite (flèche) que le variant α_{s2} A, qui se distingue mal, dans ces conditions d'électrophorèse, de la caséine α_{s1} . (N.B. : les échantillons de caséine de type II utilisés pour les figures 1a et 1b ne sont pas les mêmes).

Electrophoresis in starch gel with urea and 2-mercaptoethanol of individual casein samples showing the 3 α_{s2} casein phenotypes observed among cows of the Vosgienne breed : I : α_{s2} -Cn A/A; II : α_{s2} -Cn A/D; III : α_{s2} -Cn D/D.

- a) at pH 8.6, with the buffers of WAKE and BALDWIN (1961). Migration: toward anode. Numbering of bands on type I is that proposed by ANNAN and MANSON (1969); casein α_{s1} conceals band 2. Numbering of bands supposed to be homologous in variant α_{s2} -Cn D is indicated in type III.
- b) at pH 3.0. Migration towards cathode. Variant α_{s2} D migrates faster (arrow) than variant α_{s2} A, which is not well distinguishable in these electrophoretic conditions from α_{s1} -casein. (N.B.: The casein samples of type II used for figures 1a and 1b are not the same).

Techniques d'électrophorèse

Chaque échantillon de caséine a été examiné par trois techniques d'électrophorèse différentes : a) gel de polyacrylamide à pH 9,2 selon PETERSON (1963); b) gel d'amidon à pH 8,6 selon WAKE et BALDWIN (1961); c) gel d'amidon à pH 3,0, avec les mêmes tampons que ceux de PETERSON et KOPFLER (1966) mais dilués au demi. Les gels comportent toujours du 2-mercaptoéthanol (concentration finale d'environ 0,03 M).

Dégradations séquentielles d'Edman

Dégradation automatique : la dégradation séquentielle a été effectuée à l'aide d'un Séquenceur Beckman, modèle 890 B, équipé du système de balayage d'azote, en utilisant le programme « diméthylbenzylamine » Beckman n° 102473. Après

conversion, les dérivés phénylthiohydantoïnes (PTH) obtenus ont été identifiés par chromatographie sur couche mince en gel de silice selon BOIGNE *et al.* (1970), et, après silylation, par chromatographie en phase gazeuse selon PISANO *et al.* (1972). Les dérivés PTH de l'histidine et de l'arginine éventuellement présents dans la phase aqueuse ont été détectés respectivement à l'aide des réactifs de PAULY (BLOCK *et al.*, 1962) et de YAMADA et ITANO (1966).

Dégradation manuelle : le protocole est celui de MERCIER *et al.* (1976)

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 (MERCIER *et al.*, 1970a); phosphatase alcaline (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 et TANG, 1970). Seules seront précisées dans le texte les conditions particulières d'emploi : quantités 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, 0,1 μ mole de peptide, et les résultats ont été exprimés en moles d'acides aminés libérés par mole de peptide.

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). Les autres techniques utilisées dans ce travail ont été décrites antérieurement : électrophorèse et chromatographie préparatives sur papier, chromatographie sur colonnes de DEAE-cellulose, Dowex et Sephadex, dosage des acides aminés (GROSCLAUDE *et al.*, 1970a); hydrolyse par le bromure de cyanogène (MERCIER *et al.*, 1970b); hydrolyse acide ménagée pour la mise en évidence des phospho-amino-acides (MERCIER *et al.*, 1970c).

Nomenclature des peptides

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

Résultats

I. — Mise en évidence et analyse génétique du polymorphisme de la caséine α_{s2}

La figure 1a présente les 3 phénotypes de caséine α_{s2} observés en race Vosgienne. Sur les 227 caséines individuelles examinées, la répartition numérique de ces trois phénotypes est la suivante : I : 189; II : 36; III : 2. L'interprétation la plus vrai-

semblable de ce polymorphisme consiste à supposer qu'il est déterminé par un locus bi-allélique dont les allèles, codominants, contrôlent d'une part le variant usuel $\alpha_{s_2}\text{-Cn A}$, et d'autre part un variant non observé jusqu'ici, différant du précédent par un net décalage de l'ensemble de ses bandes vers la cathode, et appelé $\alpha_{s_2}\text{-Cn D}$. Les phénotypes I, II et III correspondent alors respectivement à l'homozygote pour l'allèle $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^A$, à l'hétérozygote $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^A/\alpha_{s_2}\text{-Cn}^D$, et à l'homozygote pour l'allèle $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^D$.

Si cette interprétation est correcte, la fréquence de l'allèle $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^D$ dans le groupe des 227 vaches est de 0,912, et celle de l'allèle $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^A$ de 0,088. Dans l'hypothèse où la structure de ce groupe est conforme à la loi de HARDY-WEINBERG, la répartition des 3 phénotypes doit être, en arrondissant à l'entier le plus proche : I : 189, II : 36; III : 2; ces valeurs théoriques sont strictement identiques aux valeurs observées, ce qui tend à confirmer l'interprétation proposée.

En race Montbéliarde, seuls les phénotypes I et II ont été observés parmi les 798 échantillons individuels de caséine, et ceci avec la répartition suivante : I : 780; II : 18. En faisant les mêmes hypothèses que ci-dessus, les fréquences alléliques sont, dans le groupe des 798 vaches *Montbéliardes* : $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^A$: 0,989; $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^D$: 0,011; la répartition théorique dans l'hypothèse de HARDY-WEINBERG (et en arrondissant à l'entier le plus proche) est dans ce cas la suivante : I : 781; II : 17; III : 0. Ces valeurs ne sont pas différentes, statistiquement, des valeurs observées. L'absence du type III, qui correspond à l'homozygote pour l'allèle $\alpha_{s_2}\text{-Cn}^D$ s'explique donc parfaitement par la faible fréquence de cet allèle en race Montbéliarde.

Compte tenu des petits effectifs de la race *Vosgienne*, et de la rareté du variant $\alpha_{s_2}\text{-Cn D}$ en race *Montbéliarde*, l'analyse du mode de ségrégation des allèles supposés du locus $\alpha_{s_2}\text{-Cn}$ ne pouvait être envisagée que sous condition de trouver des sujets de génotype supposé hétérozygote parmi les taureaux utilisés en insémination artificielle; évidemment, le génotype des mâles ne peut être connu que par déduction, en comparant les phénotypes de filles à ceux de leurs mères.

Au total 5 taureaux transmettant les deux variants ont pu être identifiés; toutefois, pour 3 seulement d'entre eux le nombre de couples mère-fille trouvés a été jugé suffisant pour que le génotype du taureau puisse être considéré comme rigoureusement établi (1 taureau *Vosgien* avec 18 couples; 2 taureaux *Montbéliards* avec respectivement 9 et 15 couples). L'examen des données électrophorétiques montre que, sur ces 42 couples, le variant $\alpha_{s_2}\text{-Cn A}$ est transmis 20 fois du père à la fille, et le variant $\alpha_{s_2}\text{-Cn D}$, 22 fois. Ces proportions ne sont pas différentes, statistiquement, de 1/2, 1/2, ce qui tend à confirmer l'hypothèse faite au départ sur le déterminisme génétique du polymorphisme observé.

A noter qu'en gel acide (pH 3,0) le variant $\alpha_{s_2}\text{-Cn D}$ révèle une migration nettement plus rapide (cathodique) que celle du variant $\alpha_{s_2}\text{-Cn A}$ (fig. 1b).

2. — Étude biochimique du variant $\alpha_{s_2}\text{-Cn D}$

Le tableau 1 donne la composition en acides aminés et phosphore de la caséine $\alpha_{s_2}\text{-D}$ purifiée (fraction correspondant à la bande 4 sur la figure 1). Par rapport à celle de la fraction homologue du variant $\alpha_{s_2}\text{-A}$ (BRIGNON *et al.*, 1976; 1977) les principales différences semblent être un déficit en résidus glutamyle et séryle, ce dernier confirmé par un déficit en phosphore, ainsi qu'un déficit en résidus lysyle. Mais des différences sont aussi possibles au niveau d'autres résidus (Asx, Gly, Ile, Leu, Tyr). La dégradation séquentielle d'Edman et l'action de la carboxy-

peptidase A sur cette caséine indiquent que ses extrémités N- et C- terminales sont les mêmes que celles du variant de référence.

Pour tenter d'identifier plus exactement les différences, la caséine α_{s2} D a été hydrolysée par le CNBr, et l'hydrolysate ainsi obtenu chromatographié sur colonne de Sephadex G 50 en milieu acide acétique 30 p. 100, urée 3,3 M, NaCl 0,5 M. Les 3 fractions, bien séparées, issues de cette colonne ont ensuite été rechromatographiées, pour dessalage, sur colonne de Sephadex G 25 dans l'acide acétique 30 p. 100. A la suite de cette opération, un peptide pur, dont la composition (tabl. 1) est visiblement homologue de celle du peptide α_{s2} A CN2 a été obtenu à partir de la fraction 2. Par contre, les fractions 1 et 3 se sont avérées insuffisamment purifiées à ce stade. La fraction 1 a donc été rechromatographiée sur colonne d'Ultrogel AcA 54 dans l'acide acétique 50 p. 100, ce qui a fourni un peptide de composition voisine de celle du peptide α_{s2} A CN5 (tabl. 1). Enfin, deux peptides, homologues de α_{s2} A CN1 et α_{s2} A CN3 ont été obtenus par chromatographie de la fraction 3 sur colonne de Dowex AG 50, W-X 2. Par contre, le peptide homologue du térapeptide α_{s2} A CN4 a été perdu au cours de la chromatographie initiale des peptides CNBr (vraisemblablement avec le pic de sels). On notera que, par souci de clarté, les peptides CNBr du variant α_{s2} D ont reçu la même désignation que leurs homologues du variant α_{s2} A (BRIGNON *et al.*, 1976).

En comparant la composition en acides aminés des peptides CNBr du variant α_{s2} D (tabl. 1) à ceux du variant α_{s2} A (BRIGNON *et al.*, 1976) on constate que le déficit en phosphosérine et acide glutamique se retrouve dans CN5 et le déficit en lysine dans CN1. Ces peptides étant de taille assez importante, il a donc été nécessaire d'entreprendre une analyse plus détaillée de la structure primaire du variant α_{s2} D. Cette analyse a comporté les opérations suivantes :

— une dégradation séquentielle automatique d'Edman appliquée à la caséine entière, puis au peptide CN1;

— l'hydrolyse, par la trypsine (E/S : 1/100; pH 7,8; 3 h; 38°) d'un hydrolysate CNBr de la caséine. Les peptides tryptiques ainsi obtenus ont été, dans un premier temps, séparés par chromatographie sur colonne de Dowex AG 50 W-X2, et dans un second temps purifiés sur colonne de Sephadex G 25 dans l'acide acétique 30 p. 100, et si nécessaire, repurifiés par électrophorèse ou chromatographie préparative sur papier. Les peptides ainsi obtenus ont été localisés, dans la séquence de référence, sur la base de leur composition en acides aminés (fig. 2);

— La détermination des résidus N- ou C-terminaux de certains peptides par dégradation manuelle d'Edman ou action des carboxypeptidases A et B.

L'ensemble de ces opérations a fourni toute une série de recoupements (fig. 2). On notera en particulier que la séquence du peptide α_{s2} D CN1 est identique à celle du peptide α_{s2} A CN1 : le déficit supposé de ce peptide en résidus lysyle était donc un artefact.

En définitive la seule différence décelable entre α_{s2} D et α_{s2} A porte sur une région du peptide CN5. On note en effet, dans α_{s2} D, l'absence du peptide tryptique correspondant, dans la séquence du variant α_{s2} A, aux résidus 46 à 70 (α_{s2} A T1). Ce peptide est remplacé dans α_{s2} D par un autre peptide α_{s2} D T4 b2 (présent dans le quatrième pic issu de la chromatographie des peptides tryptiques sur colonne de Dowex, et repurifié sur colonne de Sephadex G25, puis sur papier, par électrophorèse préparative). La séquence de ce peptide, dont la composition est donnée dans le tableau 1, a été déterminée par dégradation manuelle d'Edman (fig. 2). On voit que cette séquence est celle du peptide α_{s2} A T1 amputé d'un élément de 9 résidus d'acides aminés (4 Ser, 2 Glu, 1 Gly, 1 Ile, 1 Tyr). Compte tenu des particularités de la séquence de la caséine α_{s2} dans cette région, il y a

TABLEAU I

Composition en acides aminés et phosphore du variant α_{92} -Cn D, des peptides CNBr de ce variant, et du peptide tryptique comportant une délétion.
Amino acid and phosphorus composition of variant α_{92} -Cn D, of its CNBr peptides, and of the tryptic peptide with a deletion

Résidus d'acides aminés	Caséine α_{92} D (a)	Caséine α_{92} A (b)	Peptides CNBr de la caséine α_{92} D(c)					Peptides CNBr de la caséine α_{92} A (b)			Peptide tryptique α_{92} D T4b2
			CN1	CN2	CN3	CN5	CN1	CN2	CN3	CN5	
Asx	17,63 (18)	18	2,87 (2)	1,06 (1)		12,04 (14)	2	1	14	1,98 (2)	
Thr	14,35 (15)	15	4,01 (5)	0,95 (1)	0,95 (1)	5,85 (7)	5	1	7	1,10 (1)	
Ser	11,40 (13)	17	2,25 (2)	3,68 (5)		5,59 (6)	2	5	10	0,92 (1)	
Glx (d)	37,50 (38)	40	9,21 (10)	6,84 (7)	1,60 (1)	19,45 (20)	10	7	22	5,60 (6)	
Pro	9,86 (10)	10	2,21 (1)		2,37 (3)	6,59 (6)	1		6		
Gly	1,58 (1)	2				1,57 (1)			2		
Ala	8,08 (8)	8	2,08 (2)			5,92 (6)	2		6	2,73 (3)	
Cys/2	(f) (2)	2				(f) (2)			2		
Val	13,25 (14)	14	2,32 (2)	0,77 (1)	1,04 (2)	8,16 (9)	2	1	9	1,75 (2)	
Met (e)	3,47 (4)	4	(1)	(1)		(1)	1	1	1		
Ile	9,21 (10)	11	1,00 (1)	1,35 (2)	1,00 (2)	4,72 (5)	1	2	6		
Leu	14,21 (13)	13	4,75 (5)		0,95 (1)	7,37 (7)	5		7		
Tyr	10,00 (11)	12	2,33 (3)	0,54 (1)	1,32 (2)	4,33 (5)	3	1	6		
Phe	5,79 (6)	6	2,73 (3)			2,83 (3)	3		3		
Iys	21,84 (24)	24	5,76 (9)	2,36 (2)	3,18 (3)	9,33 (9)	9	2	9	1,05 (1)	

TABLEAU I (suite)

His	2,89 (3)	4	0,98 (1)	0,75 (1)		1,59 (1)	1	1	1
Arg	5,88 (6)	6	1,78 (2)		0,69 (1)	3,04 (3)	2	1	3
Trp	(g) (2)	2			(g) (1)	(g) (1)		1	1
P	8,37 (8)	11	(2)	3,87 (4)		(h) (1)	+	+	(h) (1)
Nombre total de résidus	198	207	49	22	17	106	49	22	115
									16

Entre parenthèses : valeurs exactes déduites de l'ensemble des investigations décrites dans ce travail.

- (a) Bande 4 (cf. fig. 1); établie à l'aide de 3 répétitions pour chacun des 3 temps d'hydrolyse habituels (24, 48 et 96 h).
 (b) Bande 4 (cf. fig. 1); d'après BRIGNON *et al.* (1976, 1977).
 (c) Le peptide CN4 (4 résidus) a été perdu au cours de la chromatographie sur colonne de Sephadex.
 (d) Glx + homoserine dans les peptides CNBr.
 (e) Présence d'homoserine lactone dans les peptides CNBr.
 (f) Valeurs non fiables; les deux cystéines ont été par contre retrouvées dans le peptide tryptique où elles sont localisées (cf. fig. 2).
 (g) Non dosé, mais révélé par coloration spécifique d'ERLICH (BLOCK *et al.*, 1962) dans les peptides tryptiques.
 (h) Mise en évidence par hydrolyse acide ménagée.

Between brackets : exact value deduced from all the investigations described in this work.

- (a) Band 4 (cf. fig. 1); established from 3 replicates for each of the 3 usual hydrolysis times (24, 48 and 96 h).
 (b) Band 4 (cf. fig. 1); according to BRIGNON *et al.* (1977).
 (c) Peptide CN 4 (4 residues) was lost during chromatography on a Sephadex column.
 (d) Glx + homoserine in CNBr peptides.
 (e) Presence of homoserine lactone in CNBr peptides.
 (f) Unreliable values; presence of 2 cysteines was checked in the tryptic peptide where they are located (cf. fig. 2).
 (g) Not determined, but identified according to the ERLICH technique (BLOCK *et al.*, 1962) in tryptic peptides.
 (h) Demonstrated by mild hydrolysis in acid.

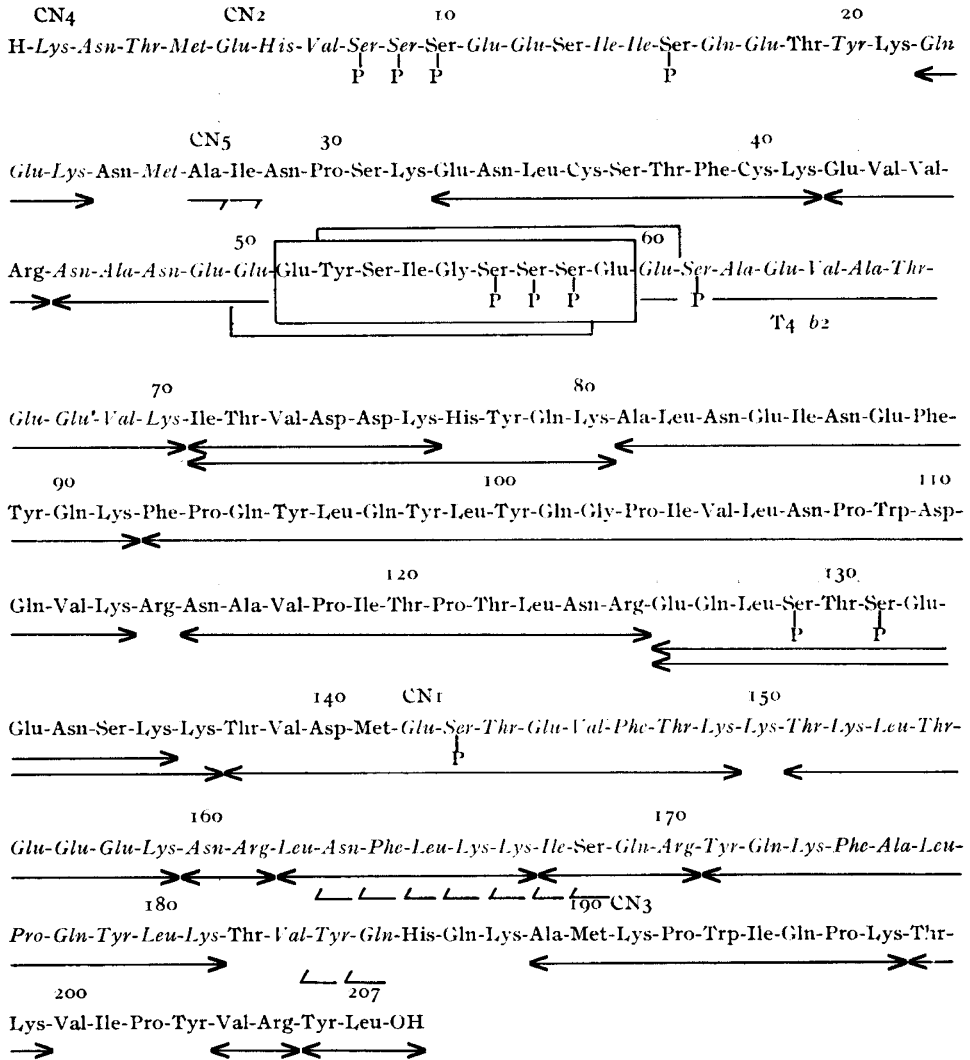


FIG. 2. — Localisation de la délétion différenciant le variant α_{s2} -Cn D du variant de référence α_{s2} -Cn A

La séquence du variant α_{s2} -Cn A est celle donnée par BRIGNON *et al.* (1977). La délétion du variant α_{s2} -Cn D est encadrée, avec ses 3 alternatives possibles. La désignation des peptides CNBr figure au-dessus de leur résidu N-terminal. En italiques : éléments de séquence établis à l'aide du séquenceur, ou (peptide T4 b2) par dégradation manuelle d'Edman; <->, sous un élément de séquence peptide tryptique; <- , acide aminé libéré à partir de la caséine et de CN 1 par les carboxypeptidases A ou B; <->, résidus identifiés, sur CN 5, par la méthode d'Edman manuelle.

Localisation of the deletion that differentiates variant α_{s2} -Cn D from the reference variant α_{s2} -Cn A. The reference sequence of variant α_{s2} -Cn A is that given by BRIGNON *et al.* (1977). Deletion of variant α_{s2} -Cn D is in box, with its 3 possible alternatives. Designation of CNBr peptides is written over their N-terminal residue. In italics: elements of sequence established with a sequencer, or (peptide T4 b2) by Edman manual degradation; <->, tryptic peptide; <- , amino acid released, from casein and CN 1, by carboxypeptidase A or B; <->, residues identified, on CN 5, by Edman manual degradation.

ambiguïté sur la localisation exacte de cette délétion (résidus 50 à 58 ou 51 à 59, ou 52 à 60).

La perte de 2 résidus Glu et de 3 résidus Ser-P explique parfaitement le comportement électrophorétique du variant α_{s2} D aussi bien à pH alcalin qu'à pH acide.

3. — Liaison génétique du locus α_{s2} -Cn avec les loci α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cn

Les loci de structure des caséines α_{s1} , β et κ sont très étroitement liés et forment une unité qui ségrège en fait comme un locus unique, transmettant des « combinaisons alléliques », formées d'un allèle de chacun des 3 loci, α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn (GROSCLAUDE *et al.*, 1972; GROSCLAUDE, 1974).

Deux des taureaux hétérozygotes au locus α_{s2} -Cn étaient également hétérozygotes à deux des trois autres loci de caséines (génotypes α_{s1} -Cn^B — β -Cn^{A2} — κ ^B-Cn / α_{s1} -Cn^C — β -Cn^{A2} — κ -Cn^A pour JACKY, Vosgien, et α_{s1} -Cn^B — β -Cn^{A2} — κ -Cn^B / α_{s1} -Cn^B — β -Cn^{A1} — κ -Cn^A pour NYLON, Montbéliard). La descendance de ces deux taureaux se prêtait donc à la recherche d'un éventuel linkage du locus α_{s2} -Cn avec les loci α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cn.

Pour cette étude, deux catégories de couples mère-fille ont été retenues :

a) des couples composés d'une fille de l'un des taureaux et de sa mère (couple mère-fille proprement dit par rapport au taureau); les allèles transmis par le père se déduisent de la comparaison du génotype de la fille avec celui de la mère;

b) dans le cas de NYLON seulement, des couples composés d'une fille de ce taureau, et d'une fille de celle-ci (couple fille-petite fille par rapport au taureau); l'examen comparatif des génotypes peut permettre, ici aussi, de déduire les allèles transmis par le taureau.

Dans ce genre d'analyse, tous les couples ne sont pas informatifs; en effet, il y a ambiguïté lorsqu'un allèle reçu par la fille peut provenir aussi bien du père que de la mère. Toutefois, dans le cas présent, la proportion de couples informatifs est élevée, d'une part parce que les taureaux retenus étaient hétérozygotes à deux des loci du groupe α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cn, et d'autre part du fait de la faible fréquence de l'allèle α_{s2} -Cn^D, surtout en race Montbéliarde.

Les résultats de l'analyse des ségrégations sont données dans le tableau 2. On constate que les deux taureaux ne transmettent que deux des quatre combinaisons attendues dans l'hypothèse d'indépendance génétique. Le locus α_{s2} -Cn est donc étroitement lié à l'unité formée par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn. On notera par ailleurs que chez les deux taureaux, l'allèle α_{s2} -Cn^D est transmis dans la même combinaison : α_{s1} ^B α_{s2} ^D β ^{A2} κ ^B (notations simplifiées).

Au niveau des populations n'ont été identifiées que deux combinaisons alléliques comportant α_{s2} -Cn^D; ce sont, en notations simplifiées : α_{s1} ^B α_{s2} ^D β ^{A2} κ ^B, déjà mentionnée, et de loin la plus fréquente, et α_{s1} ^B α_{s2} ^D β ^{A2} κ ^A trouvée chez une seule vache Vosgienne et donc beaucoup plus rare. Il existe ainsi un fort déséquilibre de linkage, ce qui confirme l'étroitesse de la liaison génétique entre le locus α_{s2} -Cn et l'unité formée par les loci α_{s1} -Cn, β -Cn, κ -Cn.

Discussion

Les fractions électrophorétiques de la caséine bovine numérotées α_{s2} , α_{s3} , α_{s1} et α_{s6} par ANNAN et MANSON (1969) ont été classées parmi les caséines « mineures » par opposition aux caséines « majeures », α_{s1} , β et κ . Toutefois, il est désormais

TABLEAU 2

Linkage du locus α_{s_2} -Cn avec l'unité génétique formée par les loci α_{s_1} -Cn, β -Cn et κ -Cn
 Linkage of locus α_{s_2} -Cn with the genetic unit formed by loci α_{s_1} -Cn, β -Cn and κ -Cn

Nom du taureau (et race)	Nombre de couples mère-fille		Allèles du père transmis aux filles			
			$\alpha_{s_1}^B$ β^{A1} κ^B		$\alpha_{s_2}^C$ β^{A2} κ^A (JACKY) ou $\alpha_{s_1}^B$ β^{A1} κ^A (NYLON)	
			Analysés	Informatifs	Avec $\alpha_{s_2}^C$ A	Avec $\alpha_{s_2}^C$ D
JACKY (Vosgienne)	(a) 19	18	0	9	9	0
NYLON (Montbéliarde)	(a) 16	15	0	8	7	0
	(b) 19	16	0	10	6	0
Totaux	54	49	0	27	22	0

Les notations sont simplifiées pour $\alpha_{s_1}^B$ β^{A2} κ^B , lire : α_{s_1} -Cn^B — β -Cn^{A2} — κ -Cn^B, etc...

(a) un couple : fille du taureau et sa mère.

(b) Un couple : fille du taureau et sa fille.

Notations are simplified: for $\alpha_{s_1}^B$ β^{A2} κ^B , read: α_{s_1} -Cn^B — β -Cn^{A2} — κ -Cn^B, etc...

(a) A pair: daughter of a bull and her mother.

(b) A pair: daughter of a bull and her daughter.

établi que ces fractions correspondent à une seule et même chaîne polypeptidique, ne différant que par leur teneur en groupements phosphate (BRIGNON *et al.*, 1976, 1977). Elles sont donc maintenant désignées, globalement, sous le vocable de caséine α_{s_2} . Or, en se référant aux dosages de RIBADEAU-DUMAS (1970), la proportion de caséine α_{s_2} dans la caséine entière est voisine de 10 p. 100, teneur qui n'est pas très différente de celle de la caséine κ (14-15 p. 100). Il n'y a donc pas de raison de maintenir une distinction d'ordre quantitatif entre les caséines α_{s_1} , β et κ d'une part, et la caséine α_{s_2} d'autre part. A l'appui de cette remarque on notera que chez la chèvre, la caséine α_{s_2} est cinq fois plus abondante, en moyenne que la caséine α_{s_1} (BOULANGER, 1976).

Le premier exemple d'un polymorphisme de la caséine α_{s_2} a été décrit assez récemment chez des yaks, bovins et zébus népalais (GROSCLAUDE *et al.*, 1976b), mais le nombre relativement faible d'échantillons de lait et surtout l'absence de renseignements d'ordre généalogique n'avaient pas permis, dans ce travail, de procéder à une analyse génétique approfondie; toutefois l'existence d'un linkage entre le locus contrôlant le polymorphisme de la caséine α_{s_2} et les loci α_{s_1} -Cn, β -Cn, κ -Cn était suggéré.

Le polymorphisme de la caséine α_{s_2} découvert dans les races *Vosgienne* et *Montbéliarde* est le premier décrit dans les races européennes. Malgré les petits effectifs de la race *Vosgienne* et la faible fréquence du variant α_{s_2} -Cn D en race *Montbéliarde*, l'analyse génétique et biochimique de ce polymorphisme a pu être effectuée avec une certaine précision.

Sur un total de 12 variants des quatre espèces de caséine dont la structure primaire a été comparée à celle du type de référence (GROSCLAUDE, 1974, GROSCLAUDE *et al.*, 1976a, et ce travail) le variant α_{s2} -Cn est le second, après α_{s1} -Cn A, qui se caractérise par la délétion d'un peptide. Il est intéressant de remarquer que, dans ce cas précis, la délétion porte sur un élément de séquence très acide, comportant notamment une grappe de 3 résidus phosphoséryle caractéristique, que l'on trouve deux fois dans la caséine α_{s2} , mais aussi une fois dans la caséine α_{s1} et dans la caséine β (BRIGNON *et al.*, 1977; MERCIER *et al.*, 1972). Cet élément de séquence semble donc avoir été particulièrement sujet à translocation, et la délétion observée dans le variant α_{s2} -Cn D peut être considérée comme un nouvel exemple de l'« instabilité » de cette région.

Nous avons discuté, dans notre travail précédent (GROSCLAUDE *et al.*, 1976b) des deux classes de modifications phénotypiques qui peuvent être provoquées par une mutation du locus α_{s2} -Cn, selon que cette mutation affecte une région commune aux différentes fractions ou une région comportant un site de phosphorylation différentiel. Comparées aux bandes du variant de référence, les bandes électrophorétiques du variant α_{s2} -Cn D paraissent simplement décalées vers la cathode. On peut donc supposer que les résidus séryle 56, 57 et 58 sont tous phosphorylés dans toutes les fractions électrophorétiques du variant de référence.

Les conséquences de cette délétion sur les propriétés physicochimiques de la caséine α_{s2} n'ont pas encore été étudiées. Toutefois, les observations faites au cours de la purification de la caséine homozygote pour le variant α_{s2} -Cn D laissent penser que certaines de ces propriétés pourraient être différentes de celles du variant de référence; ceci ne serait pas étonnant, compte tenu notamment de l'effet de la délétion sur la charge globale de la protéine.

Malgré une prospection à peu près exhaustive dans les zones d'extension principales des races Vosgienne et Montbéliarde, le nombre de couples mère-fille, utilisables pour l'analyse du déterminisme génétique du polymorphisme de la caséine α_{s2} n'est pas très élevé. Toutefois, l'ensemble de nos observations (analyse des ségrégations et existence d'un déséquilibre de linkage) permet de conclure que le locus α_{s2} -Cn est étroitement lié à l'unité génétique déjà formée des loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn. Les caséines bovines sont donc synthétisées par un groupe de 4 loci de structure étroitement liés. Cette conclusion confirme la justesse de l'interprétation des résultats de l'étude des caséines népalaises (GROSCLAUDE *et al.*, 1976b).

Notons enfin que le décalage vers la cathode des bandes électrophorétiques de la caséine α_{s2} D isole parfaitement les bandes de caséine de type α_{s1} : bande α_{s1} et bande α_{s0} (MANSON *et al.*, 1976). On constate alors — sous réserve d'employer une concentration de caséine plus faible que pour l'électrophorèse présentée dans la fig. 1 — qu'il reste, au niveau numéroté α_{s2} par ANNAN et MANSON (1969), une bande que l'on peut supposer être aussi du type α_{s1} . Dans les caséines de phénotype habituel (α_{s2} A) la bande 2 pourrait donc, en fait, correspondre à la superposition de la fraction rapide de la caséine α_{s2} (bande α_{s2}) et de la fraction lente de type α_{s1} dont il vient d'être question; l'analyse de cette dernière, qui a été purifiée par chromatographie sur DEAE-cellulose est envisagée.

Remerciements

Nous remercions tous ceux qui nous ont aidé à obtenir les échantillons de lait utiles à cette étude, et plus particulièrement MM. J. BONNEMAIRE et J. H. TEISSIER, *École nationale supérieure des Sciences agronomiques appliquées de Dijon*, J. WEHREY, président du *Herd-Book de la race*

bovine Vosgienne, J. BOILLOUX, M. RACLE, H. DELETRÉ et Y. MESSEIN, respectivement directeurs des Syndicats de contrôle laitier du Doubs, du Jura, de la Haute-Saône et de l'Ain, ainsi que J. C. MERIAUX et G. RUFFET, Laboratoire de Génétique biochimique de l'I.N.R.A.

Reçu pour publication en décembre 1978.

Summary

Polymorphism of bovine α_{82} casein: close linkage of locus α_{82} -Cn with loci α_{81} -Cn, β -Cn and κ -Cn; evidence of a deletion in variant α_{82} -Cn D

A polymorphism of α_{82} -casein was detected by gel electrophoresis in individual milks from two breeds of cows located in the eastern part of France (*Vosgienne* and *Montbéliarde*).

A genetic analysis of this polymorphism gives evidence of a variant α_{82} -Cn D which, compared to the reference type α_{82} -Cn A — the only one observed until now in European breeds — has an electrophoretic mobility which is slower at pH 8.6, and faster at pH 3.0. The frequency of α_{82} -Cn D is 0.088 in the *Vosgienne* sample (227 cows) and only 0.011 in the *Montbéliarde* sample (798 cows).

α_{82} -casein was prepared from the milk of a cow homozygous for the α_{82} -Cn D variant. The primary structure of this variant differs from that of the reference variant, α_{82} -Cn A (BRIGNON *et al.* 1977) by the deletion of a peptide, 9 amino acids in length, containing in particular one of the two clusters of 3 phosphoserine residues present in α_{82} -casein, and also found in α_{81} and β -caseins. Taking into account the characteristics of the reference variant sequence, an ambiguity exists about the exact localization of the deletion (residues 50 to 58, or 51 to 59, or 52 to 60).

The occurrence of this deletion confirms that the locus controlling the polymorphism is the structural locus for α_{82} -casein. An analysis of segregations in the progeny of two heterozygous bulls, one for the α_{82} -Cn, α_{81} -Cn and κ -Cn loci, the other for the α_{82} -Cn, β -Cn and κ -Cn loci, suggests a close linkage between the α_{82} -Cn locus and the α_{81} -Cn, β -Cn and κ -Cn cluster. The four types of bovine casein are thus controlled by four closely linked loci.

Références bibliographiques

- ANNAN W. D., MANSON W., 1969. A fractionation of the α_2 -casein complex of bovine milk. *J. Dairy Res.*, **36**, 259-268.
- 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., DREWRY J., 1959. *New procedure for the routine determination of the various non casein proteins in milk.* XV^e Cong. Intern. Lait., 3, Sect. 5, 1631-1637.
- BAMANN E., NOWOTNY 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.
- BLOCK R. J., DURRUM E. L., ZWEIG G., 1962. *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis.* Academic Press, New York.
- BOIGNE J. H., BOIGNE N., ROSA J., 1970. Description d'une ultramicrométhode d'analyse séquentielle des peptides. *J. Chromatogr.*, **47**, 238-246.
- BOULANGER A., 1976. *Étude biochimique et génétique des protéines du lait de chèvre (Capra hircus).* Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Université de Paris VII.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J. C., 1976. Premiers éléments de structure primaire des caséines α_{82} bovines. *FEBS Lett.*, **71**, 111-116.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., MERCIER J. C., PELISSIER J. P., 1977. Complete amino-acid sequence of bovine α_{82} -casein. *FEBS Lett.*, **76**, 274-279.
- GROSCLAUDE F., 1974. *Analyse génétique et biochimique du polymorphisme électrophorétique des caséines α_{81} , β et κ chez les bovins (Bos taurus) et les zébus (Bos indicus).* Thèse de Doctorat d'État-ès-Sciences, Paris.

- GROSCLAUDE F., 1976. (Résultats non publiés.)
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J. H., 1976 a. Polymorphisme des lactoprotéines de bovinés népalais. I. Mise en évidence, chez le Yak, et caractérisation biochimique de deux nouveaux variants : β -LgD_{yak} et α_{s1} -CnE. *Ann. Génét. Sél. anim.*, **8**, 461-479.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J. H., 1976b. 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? *Ann. Génét. Sél. anim.*, **8**, 481-491.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., RIBADEAU-DUMAS B., 1970. Structure primaire de la caséine α_{s1} 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.
- GUÉRIN G., 1976. (Communication personnelle.)
- HUANG W. Y., TANG J., 1970. Carboxyl-terminal sequence of human Gastricsin and Pepsin. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2189-2193.
- MALEGEANT J. Y., REPARET J., 1975. *La race bovine Vosgienne*. Mémoire d'études, École nationale supérieure des Sciences agronomiques appliquées, Dijon, 116 pp.
- MANSON W., ANNAN W. D., BARNES G. K., 1976. α_{s2} Casein: its preparation and characterisation. *J. Dairy Res.*, **43**, 133-136.
- 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., 1970a. 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., 1970b. Structure primaire de la caséine α_{s1} . Enchaînement des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène et des peptides résultant de l'hydrolyse tryptique de la caséine α_{s1} maléylée. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 439-446.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970c. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence partielle. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 453-460.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1972. Primary structure of bovine caseins. A review. *Milchwissenschaft*, **27**, 402-408.
- PETERSON R. F., 1963. High resolution of milk proteins obtained by gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, **45**, 1136-1139.
- PETERSON R. F., KOPFLER F. C., 1966. Detection of new types of β -casein by polyacrylamide gel electrophoresis at acid pH: a proposed nomenclature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 388-392.
- PISANO J. J., BRONZERT T. J., BREWER H. B. Jr, 1972. Advances in the gas chromatographic analysis of amino acid phenyl and methylthiohydantoins. *Anal. Biochem.*, **45**, 43-59.
- 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., 1971. Structure primaire de la caséine β bovine. Enchaînement de 32 résidus d'amino-acides de la partie NH₂-terminale. *Eur. J. Biochem.*, **20**, 264-268.
- THOMPSON M. P., KIDDY C. A., 1964. Genetic polymorphism in caseins of cow's milk. III. Isolation and properties of α_{s1} -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.
- WOYCHIK J. H., 1965. Preparation and properties of reduced κ -casein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 542-547.
- YAMADA S., ITANO H. A., 1966. Phenanthrenequinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines. *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 538-540.
- ZITTLE C. A., CUSTER J. H., 1963. Purification and some of the properties of α_s -casein and κ -casein. *J. Dairy Sci.*, **46**, 1183-1188.