

COMPARAISON DU POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE DES LACTOPROTÉINES DU ZÉBU ET DES BOVINS

F. GROSCLAUDE, Marie-Françoise MAHÉ et J.-C. MERCIER

Laboratoire de Génétique biochimique
et Laboratoire de Recherches sur les Protéines,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas

RÉSUMÉ

778 lactosérums et 586 solutions de caséines préparés à partir de laits individuels de zébus malgaches ont été examinés par électrophorèse en gel d'amidon ou d'acrylamide dans le but d'analyser le polymorphisme génétique des protéines du lait de zébu (*Bos indicus*), et de le comparer à celui du lait bovin (*Bos taurus*).

Les loci de structure des cinq principales lactoprotéines (α -lactalbumine, β -lactoglobuline, caséines α_{s1} , β et κ) sont tous bi-alléliques et déterminent les variants classiques suivants : La A et B ; Lg A et B ; α_{s1} -B et C ; β A¹ et A² ; κ A and B. Les variants β B et β D n'ont pas été trouvés au cours de cette étude. Les fréquences alléliques observées dans l'échantillon, ainsi que les fréquences des combinaisons alléliques contrôlées par l'unité génétique formée des trois loci, α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn, sont indiquées dans le tableau 1. La comparaison des fréquences alléliques observées dans les cinq sous-échantillons géographiques les plus importants indique que la population de zébus considérée présente une certaine homogénéité génétique.

Les substitutions d'acides aminés responsables des différences de mobilité électrophorétique entre les variants α_{s1} B et C, β A¹ et A² et κ A et B, ont été caractérisées en suivant, en général, les méthodes précédemment appliquées par notre équipe à l'étude des variants des caséines bovines. Elles sont toutes identiques aux substitutions trouvées chez les bovins, y compris lorsque les variants α_{s1} -C et β A¹ sont commandés par la combinaison allélique α_{s1} -Cn^C- β -Cn^{A¹} [substitutions 192 Glu (α_{s1} -B) \rightarrow Gly (α_{s1} -C), 67 Pro (β A²) \rightarrow His (β A¹) et 148 Asp (κ A) \rightarrow Ala (κ B)]. Par ailleurs, l'étude d'un échantillon de caséine β B, préparé à partir du lait d'un zébu *Choa* (République Tchadienne), indique que ce variant diffère de β A¹, comme chez les bovins, par la substitution 122 Ser (β A¹) \rightarrow Arg (β B), ce qui rend discutable l'utilisation d'une notation particulière (β Bz) pour désigner le variant β B du zébu. Selon toute vraisemblance, et pour chacun des trois loci, le polymorphisme commun à *Bos taurus* et à *Bos indicus* dérive de mutations uniques, antérieures à la divergence phylogénétique de ces deux rameaux du genre *Bos*, qui s'est produite, selon EPSTEIN (1971), en Asie du sud-ouest, vers les quatrième et troisième millénaires avant notre ère. Le fait que l'allèle prédominant du locus α_{s1} -Cn ne soit pas le même chez *Bos taurus* (α_{s1} -B) que chez *Bos indicus* (α_{s1} -C) peut être dû au jeu de la dérive génétique pendant la phase de sélection en effectif limité qui a sans doute accompagné la domestication.

Outre les deux substitutions déjà trouvées chez les bovins — 148 Asp (κ A) \rightarrow Ala (κ B) responsable de la différence de charge nette, et 136 Thr (κ A) \rightarrow Ile (κ B), sans effet sur la charge — les « caséino-macropéptides » les variants κ A et κ B diffèrent, chez le Zébu malgache, par une troisième substitution, 135 Ile (κ A) \rightarrow Thr (κ B), sans effet sur la charge. Compte tenu du petit nombre d'échantillons de caséine étudiés dans les deux cas, on ne peut tirer, de cette observation, aucune conclusion générale.

Un échantillon de caséine βD a été préparé à partir de prélèvements de laits individuels provenant de deux sujets Yak \times Zébu népalais ; βD diffère de βA^2 par la substitution 18 SerP (βA^2) \rightarrow Lys (βD), qui est, selon toute vraisemblance, la seule substitution impliquée dans la différence de charge nette entre ces deux variants.

Contrairement à ce qui s'observait dans les données, peu nombreuses il est vrai, de BLUMBERG et TOMBS (1958), la répartition des génotypes aux loci α -La et β -Lg dans notre échantillon de population de zébus malgaches est tout à fait conforme à celle qui est attendue dans l'hypothèse d'indépendance génétique entre ces deux loci. En ce qui concerne les loci α_{s1} -Cn et β -Cn, on ne retrouve pas, dans la population de zébus considérée, où la combinaison allélique α_{s1} -Cn^C— β -Cn^{A1} coexiste avec les combinaisons α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A2}, α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A1} et α_{s1} -Cn^C— β -Cn^{A2}, un déséquilibre de linkage aussi accusé que celui qui s'observe dans de nombreuses races bovines occidentales, françaises notamment. Cette situation particulière peut s'expliquer par le fait que l'effectif génétique de la population de zébus malgache est sans doute beaucoup plus élevé que celui de la plupart des races bovines occidentales.

INTRODUCTION

De rapides progrès ont été réalisés, au cours de ces dernières années, dans le domaine de la biochimie des principales lactoprotéines bovines et de leurs variants génétiques : la structure primaire de l' α -lactalbumine (BREW *et al.*, 1970), celle de la β -lactoglobuline (BRAUNITZER *et al.*, 1972), et celle des caséines α_{s1} (MERCIER *et al.*, 1971), β (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972), et κ (MERCIER *et al.*, 1973) ont, en effet, été complètement élucidées ; d'autre part, toutes les altérations différenciant les variants génétiques de la β -lactoglobuline (BRAUNITZER *et al.*, 1972 ; BRIGNON *et al.*, 1973) et des caséines α_{s1} , β et κ (GROSCLAUDE *et al.*, 1972, a, b ; 1974 b) ont été identifiées et localisées, à l'exception de la substitution His/Gln caractérisant le variant β -Lg C (BELL *et al.*, 1968) qui n'a pas été définitivement localisée dans la chaîne polypeptidique de la β -lactoglobuline (1).

Le déterminisme génétique des caséines α_{s1} , β et κ bovines présente des caractères originaux : ces trois protéines sont en effet sous le contrôle de trois loci de structure très étroitement liés ; ceci se traduit, au niveau des populations, et surtout entre les allèles des loci α_{s1} -Cn et β -Cn, par un déséquilibre de linkage très accusé, caractérisé par l'absence ou l'extrême rareté de certaines combinaisons alléliques, ou « complexes géniques » (voir l'analyse récente de GROSCLAUDE *et al.*, 1972 c).

Les diagrammes d'électrophorèse de lactosérums et de caséines de zébu (*Bos indicus*) présentent, avec ceux des bovins (*Bos taurus*), une remarquable similitude. Les variants bovins les plus fréquents se retrouvent en effet chez le Zébu, et les différences relevées jusqu'à présent entre les deux sous-genres ne portent que sur leurs variants les moins répandus. Sur la base des inventaires effectués jusqu'à présent — beaucoup plus nombreux chez les bovins — les variants électrophorétiques des 5 lactoprotéines principales peuvent se classer comme suit :

— variants présents à la fois chez les bovins et les zébus :

α_{s1} -Cn B et C ; β -Cn A¹, A² et B ; κ -Cn A et B ; β -Lg A et B ; α -La A et B.

A noter que le variant α -La A, qui a pu être considéré comme spécifique du zébu, existe en fait dans certaines races bovines (GROSCLAUDE, 1968) ;

(1) Les données de BELL *et al.* (1968) semblent toutefois indiquer que cette substitution se situe en position 59 dans la séquence établie par BRAUNITZER *et al.* (1972).

— variants qui ne semblent présents que chez les bovins :

α_{s1} -Cn A et D ; β -Cn A³, C et E ; β -Lg C et D ;

— variant qui ne semble présent que chez les zébus : β -Cn D.

A l'exception du travail de BELL, *et al.* (1970) sur le variant α -La A, aucune étude biochimique complète n'a été effectuée sur les variants des lactoprotéines de zébu. Cependant, le fait que les principaux variants des lactoprotéines de bovins et de zébus se correspondent exactement en électrophorèse ne signifie pas nécessairement que ces variants diffèrent, dans les deux sous-genres, par les mêmes substitutions d'acides aminés. Les résultats obtenus jusqu'ici sur les caséines α_{s1} et β (ASCHAFFENBURG *et al.*, 1968 ; THOMPSON *et al.*, 1969) ont donné, sur ce point, des indications divergentes : en effet, les fingerprints tryptiques et chymotryptiques du variant α_{s1} -C, comme du variant β -A³, paraissent identiques chez *Bos taurus* et chez *Bos indicus* ; par contre les fingerprints et la composition globale en acides aminés du variant β -B présentent quelques différences entre les deux sous-genres, ce qui a conduit à introduire une notation différente pour le variant β -B de zébu (β Bz).

Sur le plan génétique, l'existence chez le Zébu, d'un déséquilibre de linkage entre les allèles des loci α_{s1} -Cn et β -Cn (ASCHAFFENBURG *et al.*, 1968) révèle, comme on pouvait s'y attendre, la même organisation génétique que chez les bovins. Par contre, la prédominance de l'allèle α_{s1} -Cn^C, qui est de règle dans les populations de zébus, contraste avec celle de l'allèle α_{s1} -Cn^B dans les populations bovines (ASCHAFFENBURG, 1968) ; cette différence appelle une explication et incite par ailleurs à rechercher si, dans ces conditions, les combinaisons alléliques de l'unité génétique α_{s1} -Cn— β -Cn— α -Cn sont, chez *Bos indicus*, les mêmes que chez *Bos taurus*.

Il nous a donc semblé intéressant, pour prolonger notre analyse génétique et biochimique du polymorphisme des caséines bovines (GROSCLAUDE *et al.*, 1966 ; 1972 a, b, c), d'entreprendre un travail similaire chez le Zébu, en nous attachant d'une part à inventorier les variants électrophorétiques et les combinaisons alléliques propres à *Bos indicus* à partir d'un échantillon de population assez important, et d'autre part à identifier les altérations différenciant les variants ainsi détectés pour les comparer à celles qui différencient les variants de *Bos taurus*.

Il paraissait également indiqué de profiter de l'existence, qui est de règle chez le Zébu (BHATTACHARYA *et al.*, 1963 ; ASCHAFFENBURG, 1968) d'un polymorphisme de l' α -lactalbumine pour tenter de préciser les relations existant entre les loci α -La et β -Lg ; BLUMBERG et TOMBS (1958) ont en effet publié des données suggérant que ces loci pouvaient être génétiquement liés, ce que personne ne semble avoir tenté de vérifier par la suite.

Le travail qui fait l'objet de la présente publication a été entrepris, à l'aide de lait de zébus provenant de la République Malgache, pour tenter de répondre à l'ensemble de ces questions. L'absence des variants β Bz et β D dans cet échantillon de population nous a par ailleurs conduits à faire appel, pour l'étude biochimique de ces variants, à d'autres sources de caséines de zébus (République Tchadienne, Népal).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine et conditionnement des échantillons

788 échantillons individuels de lait de zébu ont été prélevés par l'un de nous (J.-C. M.) du 15 mars au 8 avril 1968, dans les troupeaux expérimentaux ou dans les élevages localisés comme suit (entre parenthèses : nombre d'échantillons) : troupeaux expérimentaux des Centres de Recherches de Kianjasoa (17), Sainte-Marie (24) et Miadana (58) ; élevages des régions de Kianjasoa (26), Miadana (15), Majunga (128), Tuléar (87), Betsioky (97), Ejeda (36), Ampanihy (82), Beloha (41), Ambovombe (28), Isoanala (94) et Betroka (55). (voir fig. 1). Ces échantillons ont été autant que possible maintenus au frais (vers + 4°C), après addition d'une solution aqueuse de bichromate de potassium (1 g/l) à raison de 2 gouttes pour un tube de 15 ml.

Après détermination, à Jouy en Josas, de leurs variants génétiques, 3 échantillons individuels provenant du Centre de recherches de Kianjasoa, et 2 d'un élevage de la même région, ont été prélevés en plus grande quantité (environ 1 litre) ; 6 autres échantillons individuels d'un litre environ ont été prélevés au hasard dans la région de Majunga. Pour ces prélèvements, le bichromate de potassium a été remplacé par du toluène (5 ml par flacon d'un litre).

Tous les échantillons ont été expédiés en France par avion au fur et à mesure de leur prélèvement.

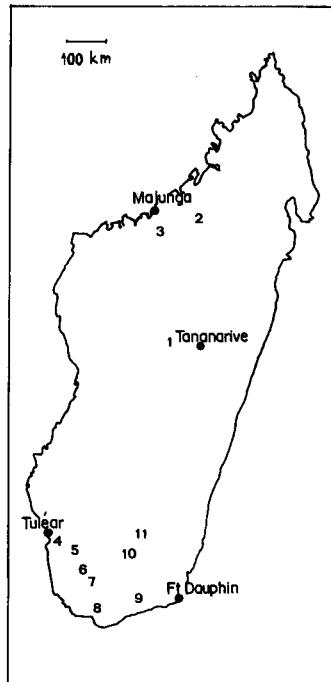


FIG. 1. — Régions de provenance des prélèvements de laits individuels de zébus malgaches :

1 : Kianjasoa ; 2 : Sainte-Marie, Miadana ; 3 : Majunga ; 4 : Tuléar ; 5 : Betsioky ;
6 : Ejeda ; 7 : Ampanihy ; 8 : Beloha ; 9 : Ambovombe ; 10 : Isoanala ; 11 : Betroka.

Origine des produits

A l'exception de la thermolysine (Merck 6 000 PU/mg) et de l' amino-peptidase M (Röhm 2 500 mU/mg) les enzymes utilisées proviennent de la firme Worthington Biochemical Corporation : trypsine (2 × cristallisée TRL 7AA) ; leucine aminopeptidase (LAP DFP 5,9 mg/ml) ;

carboxypeptidase A (COA DFP 50 mg/ml) ; carboxypeptidase B (COB DFP 2,9 mg/ml) ; phosphatase alcaline (BAPC OCB 10 mg/ml).

L'origine des autres produits est la suivante : anhydride maléique Prolabo ; isothiocyanate de phényle, Fluka redistillé ; acide trifluoroacétique, Eastman ; bromure de cyanogène, Schuchardt ; hydrazine hydratée, Prolabo, retraitée au laboratoire (indice de réfraction de l'hydrazine anhydre obtenue : $\alpha_D^{20} = 1,467$) ; Dowex AG 50 WX 2, 200-400 mesh, Biorad ; Sephadex, Pharmacia.

Préparation des caséines entières et des lactosérums

Les caséines et les lactosérums ont été préparés, à partir des 11 prélèvements de lait d'un litre, selon la technique décrite par MERCIER *et al.* (1968) ; par contre, les 788 échantillons de petit volume ont été traités par la technique simplifiée d'ASCHAFFENBURG et DREWRY (1959). Les lactosérums ont été conservés à + 4°C, et les caséines, lyophilisées.

Préparation des caséines α_{s1} , β et κ

Les caséines α_{s1} , β et κ ont été préparées par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose selon MERCIER *et al.* (1968). Pour la caséine κ , nous avons retenu la fraction principale, dépourvue de glucides (fraction κA_1 pour le variant κA , κB_1 pour le variant κB).

Techniques d'électrophorèse

Chaque échantillon de caséine a été examiné par trois techniques d'électrophorèse différentes : a) gel d'acrylamide 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 sont toujours additionnés de β -mercaptoéthanol (concentration finale d'environ 0,03 M).

Les échantillons de lactosérums ont été examinés par les mêmes techniques d'électrophorèse en gel d'amidon (pH 8,6 et 3,0) que les caséines.

Techniques biochimiques

A l'exception de la technique de dosage de la phosphosérine appliquée dans l'étude du seul variant βD , toutes les techniques utilisées dans ce travail ont été décrites dans nos publications antérieures : maléylation, électrophorèses et chromatographies sur papier, chromatographies sur colonnes de DEAE-cellulose, Dowex et Sephadex, dosage des acides aminés, dosage du phosphore, hydrolyse par la trypsine (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 a) ; dégradation soustractive d'Edman, hydrolyse par la chymotrypsine, la pepsine, les carboxypeptidases A et B, la leucine aminopeptidase, (MERCIER *et al.*, 1970 a, complété, pour la carboxypeptidase A, par GROSCLAUDE *et al.*, 1970 b) ; hydrolyse par le bromure de cyanogène (MERCIER *et al.*, 1970 b) par la thermolysine (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1971 a), par la phosphatase alcaline (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1971 b) ; hydrolyse par la leucine aminopeptidase M et hydrazinolyse (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972). A noter que, pour les hydrolyses enzymatiques à pH alcalin, le tampon *Tris*-HCl a été remplacé, en général, par un tampon volatil, l'acétate de N-éthylmorpholine, 0,2 M, pH 8,6 (HUANG et TANG, 1970).

Technique de dosage de la phosphosérine appliquée dans l'étude du variant βD

Le peptide, préalablement desséché, est soumis, pendant 5 heures, à une hydrolyse acide ménagée dans HCl concentré à 80°C, en tube scellé sous vide ; les acides aminés libérés, y compris la phosphosérine, sont dosés à l'analyseur d'acides aminés : le rapport de la quantité de phosphosérine à la quantité unitaire d'un autre acide aminé peut donner une excellente estimation de la teneur du peptide en phosphosérine : c'est ainsi que pour le peptide $\beta A^2 T_1$, qui contient 4 phosphosérines et une glycine, le rapport PSer/Gly est, en moyenne, pour 5 mesures indépendantes, de $3,88 \pm 0,20$.

Techniques biophysiques

La spectrométrie de masse a été effectuée, après N-acétylation et perméthylation selon VILKAS *et al.* (1968) et THOMAS (1969).

Nomenclature des peptides

La nomenclature des peptides résultant de l'hydrolyse d'un peptide plus long fait intervenir dans l'ordre, trois éléments : a) la dénomination du peptide de départ, b) les initiales du nom de l'enzyme ou du réactif ayant servi à l'hydrolyse (Th = thermolysine ; CN = bromure de cyanogène, etc.), c) un numéro d'ordre, attribué en fonction du résultat de l'opération de fractionnement effectuée. Le numérotage des peptides se fait dans l'ordre d'éluion pour une chromatographie sur colonne, de l'anode vers la cathode pour une électrophorèse préparative sur papier, et dans le sens des mobilités croissantes pour une chromatographie préparative sur papier. Par ailleurs l'appellation du peptide comporte, si besoin est, le nom du variant génétique dont il provient.

RÉSULTATS

I. — *Analyse génétique du polymorphisme électrophorétique de l' α -lactalbumine, de la β -lactoglobuline et des caséines α_{s1} , β et κ*

I. I. *Inventaire et fréquence des variants génétiques.*

Par suite du mauvais état de conservation du quart environ des prélèvements de lait individuels, l'analyse du polymorphisme des caséines ne porte au total que sur 586 des 788 prélèvements effectués ; par contre l'analyse du polymorphisme de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline a pu se faire sur 778 prélèvements.

TABLEAU I

Fréquences alléliques aux loci α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn, et fréquences des combinaisons alléliques de l'unité génétique formée par ces trois loci, calculées sur un échantillon de 586 vaches zébu ; fréquences alléliques aux loci α -La et β -Lg, calculées sur un échantillon de 778 vaches zébu.

Fréquences alléliques	Fréquence des combinaisons alléliques (1) de l'unité génétique α_{s1} -Cn— β -Cn— κ -Cn
<i>Caséines</i>	
α_{s1} -Cn $\left\{ \begin{array}{l} B = 0,166 \\ C = 0,834 \end{array} \right.$	BA ¹ A = 0,015 BA ¹ B = 0,012 BA ² A = 0,085 BA ² B = 0,054
β -Cn $\left\{ \begin{array}{l} A^1 = 0,099 \\ A^2 = 0,901 \end{array} \right.$	CA ¹ A = 0,055 CA ¹ B = 0,017 CA ² A = 0,594 CA ² B = 0,168
κ -Cn $\left\{ \begin{array}{l} A = 0,749 \\ B = 0,251 \end{array} \right.$	
<i>Protéines du lactosérum</i>	
α -La $\left\{ \begin{array}{l} A = 0,166 \\ B = 0,834 \end{array} \right.$	
β -Lg $\left\{ \begin{array}{l} A = 0,272 \\ B = 0,728 \end{array} \right.$	

(1) Pour BA¹A, lire : α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A¹}— κ -Cn^A, etc.

On constate (tabl. 1) que les loci de structure des 5 lactoprotéines principales sont tous bialléliques dans l'échantillon de population étudié ; ils déterminent les variants classiques suivants : α_{s1} -Cn B et C, β -Cn A¹ et A², κ -Cn A et B, α -La A et B, β -Lg A et B. Notre échantillon n'étant pas représentatif d'une population bien définie, les fréquences observées, qui sont données dans le tableau 1, n'ont pas été assorties d'intervalles de confiance. On notera toutefois qu'un test d'homogénéité, appliqué aux fréquences calculées dans les 5 sous-échantillons provenant des régions ayant fourni les plus grands nombres de prélèvements, indique que la population de zébus sondée présente une réelle homogénéité (tabl. 2). L'échantillon total peut donc être considéré comme relativement représentatif de l'ensemble des régions d'élevage visitées.

TABLEAU 2

Fréquences alléliques aux loci α -La, β -Lg, α_{s1} -Cn, β -Cn et κ -Cn dans les sous-échantillons provenant de 5 régions ayant fourni le plus grand nombre de prélèvements de laits individuels, et tests d'homogénéité des ces fréquences. Chaque locus étant biallélique, un seul allèle suffit à le caractériser.

En italiques ; effectif de l'échantillon, qui n'est pas nécessairement le même, dans une même région, pour les différents loci (dégradation inégale des diverses espèces protéiques dans les prélèvements mal conservés).

Allèle	Régions de provenance des sous-échantillons*					Test d'homogénéité χ^2 4 d.d.l.
	Sainte-Marie et Miadana (2)	Majunga (3)	Tuléar (4)	Betioky (5)	Isoanala (10)	
α -La ^A	0,126 <i>95</i>	0,189 <i>82</i>	0,129 <i>85</i>	0,168 <i>95</i>	0,185 <i>92</i>	4,72
β -Lg ^A	0,332 <i>95</i>	0,274 <i>82</i>	0,247 <i>85</i>	0,253 <i>95</i>	0,245 <i>94</i>	5,04
α_{s1} -Cn ^B	0,118 <i>89</i>	0,176 <i>74</i>	0,175 <i>63</i>	0,178 <i>87</i>	0,135 <i>85</i>	3,96
β -Cn ^{A1}	0,069 <i>94</i>	0,120 <i>79</i>	0,120 <i>71</i>	0,082 <i>92</i>	0,095 <i>84</i>	4,00
κ -Cn ^B	0,178 <i>90</i>	0,238 <i>82</i>	0,218 <i>71</i>	0,221 <i>86</i>	0,360 <i>68</i>	15,36**

* Significatif au seuil de 1 p. 100, mais la fréquence de κ -Cn^B dans la région (10) peut être surestimée *

** Entre parenthèses le numéro indiquant ces régions sur la figure 1.

On retrouve chez le Zébu malgache deux caractéristiques de toutes les races ou populations de zébus étudiées jusqu'à présent : l'existence d'un polymorphisme au locus α -La, et la nette prédominance, au locus α_{s1} -Cn, de l'allèle α_{s1} -Cn^C (ASCHAFFENBURG, 1968 ; ASCHAFFENBURG *et al.*, 1968) qui contraste avec la prédominance de l'allèle α_{s1} -Cn^B dans toutes les races bovines. Par contre, on notera, l'absence inhabituelle, au locus β -Cn, des variants β Bz et β D.

1. 2. *Relation génétique entre les loci α -La et β -Lg.*

Le tableau 3 donne la répartition des 778 vaches zébus de notre échantillon en fonction de leur génotype aux loci α -La et β -Lg. On note un excès significatif d'hétérozygotes au locus α -La (dernière colonne; $\chi^2 = 4,2$; 1 ddl; $P < 0,05$), mais, contrairement à ce qui semblait apparaître dans les données, très peu nombreuses il est vrai (46 laits individuels), de BLUMBERG et TOMBS (1958), la répartition observée, calculée à partir des répartitions marginales, concorde remarquablement avec celle qui est attendue dans l'hypothèse d'indépendance génétique des deux loci.

TABLEAU 3

Répartition de 778 vaches zébu en fonction de leur génotype aux loci α -La et β -Lg
 Entre parenthèses : nombres attendus dans l'hypothèse d'équilibre génétique ;
 en italiques : nombres attendus dans l'hypothèse d'indépendance génétique
 des loci α -La et β -Lg

α -La	β -Lg			Total
	A/A	A/B	B/B	
A/A	37 <i>35</i>	219 <i>221</i>	277 <i>277</i>	533 (541)
A/B	14 <i>15</i>	97 <i>96</i>	120 <i>120</i>	231 (215)
B/B	— <i>1</i>	6 <i>6</i>	8 <i>7</i>	14 (22)
Total	51 (58)	322 (308)	405 (412)	778

1. 3. *Relations génétiques entre les loci α_{s1} -Cn, β -Cn et α -Cn.*

Le tableau 4 donne la répartition des 586 vaches zébus de notre échantillon en fonction de leur génotype aux loci α_{s1} -Cn et β -Cn. Contrairement à ce qui s'observe dans les races bovines françaises, où la combinaison allélique α_{s1} -Cn^C— β -Cn^A n'a pas été trouvée jusqu'ici (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 c; GROSCLAUDE, 1974) on note, chez le Zébu malgache, la coexistence des combinaisons α_{s1} -Cn^B— β -Cn^A et α_{s1} -Cn^C— β -Cn^A. Le tableau 1 donne les fréquences, dans l'échantillon, des combinaisons alléliques de l'unité génétique α_{s1} -Cn— β -Cn— α -Cn, calculées par la méthode itérative de CEPPELLINI *et al.* (1956).

Du fait de l'existence de la combinaison α_{s1} -Cn^C— β -Cn^A, le déséquilibre de linkage est donc moins flagrant chez le Zébu malgache que dans les races bovines françaises. La méthode d'analyse de HILL (1974) donne sur ce point les résultats suivants :

— entre les allèles des loci α_{s1} -Cn et β -Cn :

$$D = f_{BA^1}f_{CA^2} - f_{BA^2}f_{CA^1} = + 0,0105$$

avec $k = 5,2$ (significatif : $P < 0,05$)

— entre les allèles des loci α_{s_1} -Cn et κ -Cn :

$$D = f_{BA}f_{CB} - f_{BB}f_{CA} = -0,0271$$

avec $k = 16,4$ (significatif : $P < 0,01$)

— entre les allèles des loci β -Cn et κ -Cn :

$$D = f_{A^1A}f_{A^2B} - f_{A^1B}f_{A^2A} = -0,0042$$

avec $k = 0,6$ (non significatif)

TABLEAU 4

Répartition de 586 vaches zébu en fonction de leur génotype aux loci α_{s_1} -Cn et β -Cn

Entre parenthèses : nombres attendus dans l'hypothèse d'équilibre génétique ;
en italiques : nombres attendus dans l'hypothèse d'indépendance génétique
des loci α_{s_1} -Cn et β -Cn

α_{s_1} -Cn	β -Cn			Total
	A ¹ /A ¹	A ¹ /A ²	A ² /A ²	
B/B	— —	5 3	12 13	17 (16)
B/C	3 2	35 28	122 132	160 (162)
C/C	3 4	64 73	342 331	409 (408)
Total	6 (6)	104 (104)	476 (476)	586

On peut donc déceler un déséquilibre de linkage entre les allèles des loci α_{s_1} -Cn et β -Cn d'une part, et α_{s_1} -Cn et κ -Cn, d'autre part. Cependant, si on se base sur l'ensemble des 3 valeurs de k obtenues, le déséquilibre apparaît de manière générale moins accusé dans cette population que dans les races françaises où nous avons effectué les mêmes tests (GROSCLAUDE, 1974). On notera par ailleurs qu'en ce qui concerne le couple α_{s_1} -Cn, β -Cn, le déséquilibre de linkage se traduit, en définitive, par une sous-représentation de la combinaison allélique α_{s_1} -Cn^c— β -Cn^{A¹}, observation à rapprocher du fait que c'est cette combinaison qui n'a pas été trouvée jusqu'ici dans les races bovines françaises. Il est donc logique de considérer α_{s_1} -Cn^c— β -Cn^{A¹} comme la combinaison recombinante.

On notera cependant et c'est là un point capital que les conclusions de cette discussion ne restent valables que si les variants α_{s_1} -C et β -A¹ contrôlés par la combinaison α_{s_1} -Cn^c— β -Cn^{A¹} sont identiques aux variants contrôlés par les combinaisons α_{s_1} -Cn^B— β -Cn^{A¹} et α_{s_1} -Cn^c— β -Cn^{A²}. Nous avons vérifié cette identité, qui ressort des résultats exposés dans le paragraphe suivant.

2. — *Caractérisation des altérations qui différencient les variants électrophorétiques des caséines α_{s1} , β et κ de zébu*

2. 1. *Variants α_{s1} -B et α_{s1} -C contrôlés par les combinaisons alléliques classiques.*

La caséine α_{s1} -B a été préparée à partir du lait d'une femelle zébu homozygote pour l'allèle α_{s1} -Cn^B, mais hétérozygote aux loci β -Cn et κ -Cn (β -Cn^{A1}/ β -Cn^{A2} et κ -Cn^A/ κ -Cn^B), et la caséine α_{s1} -C à partir du lait d'un sujet homozygote pour la combinaison α_{s1} -Cn^C— β -Cn^{A2}— κ -Cn^A.

Nous avons montré précédemment que, chez les bovins, les variants α_{s1} -B et α_{s1} -C diffèrent par une substitution d'acides aminés située dans la partie COOH-terminale de la chaîne polypeptidique de la caséine [substitution 192 Glu (α_{s1} -B) \rightarrow Gly (α_{s1} -C)]; après hydrolyse trypsique de la caséine α_{s1} maléylée, le peptide COOH-terminal, α_{s1} -Tm2, peut être obtenu par chromatographie sur colonne de résine Dowex AG 50 WX 2, par simple élution à l'aide du premier tampon, de pH 3,1 (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 a). Nous avons donc recherché, en suivant un protocole strictement identique dans les deux cas, si les variants α_{s1} -B et α_{s1} -C du zébu se différenciaient par la même substitution.

Soixante μ Moles de caséine α_{s1} préalablement maléylée ont été hydrolysées par la trypsine (E/S : 1/50 ; 40°C ; 1 heure 30 ; pH 8,0) ; l'hydrolysate ainsi obtenu a été ensuite chromatographié, après démaléylation, sur colonne de Dowex AG 50 WX 2. Le peptide α_{s1} -Tm2, obtenu par élution à l'aide du tampon de pH 3,1, a été repurifié par chromatographie sur colonne de Sephadex G-25 en milieu acétique 30 vol. p. 100.

La composition en acides aminés des peptides α_{s1} -BTm2 et α_{s1} -CTm2 de zébu s'est avérée identique à celle des peptides homologues bovins, la différence entre ces deux peptides ne portant que sur la teneur en glycine et en acide glutamique (4 Glx et 4 Gly dans α_{s1} -CTm2, 5 Glx et 3 Gly dans α_{s1} -BTm2).

Vingt μ Moles de chacun de ces deux peptides ont alors été hydrolysés par la trypsine (E/S : 1/100 ; 40°C, 3 heures ; pH 8,6) puis par la thermolysine (E/S : 1/200 ; 40°C ; 1 heure ; pH 8,6) ; les hydrolysats ainsi obtenus, ont ensuite été chromatographiés sur colonne de Sephadex G-15 en milieu acétique 30 vol. p. 100. Le second pic, qui est aussi le plus important du chromatogramme, contient, entre autres, un peptide de migration rapide en électrophorèse, à pH 1,9. Ce peptide, α_{s1} Tm2T1Th4, repurifié par électrophorèse préparative sur papier, et dont la composition est donnée dans le tableau 5, ne peut correspondre qu'à l'élément de séquence de la caséine α_{s1} qui comprend les résidus 186 à 193 inclus. L'action des carboxypeptidases B et A (tabl. 5) montre que chez les zébus comme chez les bovins, les variants α_{s1} -B et α_{s1} -C diffèrent par une substitution 192 Glu (α_{s1} -B) \rightarrow Gly (α_{s1} -C).

2. 2. *Variants βA^1 et βA^2 contrôlés par les combinaisons alléliques classiques.*

Aucun des 11 échantillons de caséine entière de zébu malgache dont nous disposons en quantités importantes n'étant du type homozygote pour βA^1 , nous avons été amenés à opérer sur une caséine de type hétérozygote, $\beta A^1/A^2$, préparée par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, à partir de la même caséine entière que la caséine α_{s1} -B.

TABLEAU 5

<i>Caséine α_{s1}</i>	
● <i>Peptide $\alpha_{s1}BTm2T1Th4$</i>	
Composition en acides aminés	Asx, 1,00 (1) ; Ser, 1,61 (2) ; Glx, 2,07 (1) ; Gly, 0,89 (1) ; Ile, 0,82 (1) ; Lys, 0,89 (1).
Carboxypeptidases B et A	(CPB : 2 μ l ; 16 h) (CPA : 2 μ l ; 20 h) Lys, 0,78 ; Glu, 0,88.
Séquence bovine homologue (résidus 186-193)	Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys.
● <i>Peptide $\alpha_{s1}CTm2T1Th4$</i>	
Composition en acides aminés	Asx, 0,96 (1) ; Ser, 1,65 (2) ; Glx, 1,12 (1) ; Gly, 2,00 (2) ; Ile, 0,88 (1) ; Lys, 0,94 (1).
Carboxypeptidases B et A	(CPB : 2 μ l ; 24 h) (CPA : 2 μ l ; 24 h) Lys, 0,76 ; Gly, 0,49 ; Ser, 0,29.
Séquence bovine homologue (résidus 186-193)	Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Gly-Lys
<i>Caséine β</i>	
● <i>Peptide βA^2CNIT4</i>	
Composition en acides aminés	Asx, 1,00 (1) ; Thr, 0,89 (1) ; Ser, 0,92 (1) ; Glx, 2,10 (2) ; Pro, 4,40 (5) ; Gly, 1,00 (1) ; Ala, 0,97 (1) ; Val, 0,97 (1) ; Ile, 1,59 (2) ; Leu, 1,03 (1) ; Tyr, 0,54 (1) ; Phe, 1,76 (2) ; His, 0,73 (1).
Leucine aminopeptidase	(2 μ l ; 16 h) Ile, 0,94 ; His, 0,45.
Carboxypeptidase A	(5 μ l ; 24 h) —
Séquence bovine homologue (résidus 49-68)	Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn.
● <i>Peptide $\beta A^1CNITm2Th2d$</i>	
Composition en acides aminés	Asx, 1,20 (1) ; Pro, 2,64 (3) ; Gly, 0,92 (1) ; Val, 0,72 (1) ; Ile, 1,08 (1) ; Tyr, 0,48 (1) ; Phe, 0,76 (1) ; His, 0,80 (1).
Carboxypeptidase A	(5 μ l ; 24 h) Asn, 0,63 ; His, 0,56.
Séquence bovine homologue (résidus 59-68)	Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn.
● <i>Peptide $\beta BT14a$</i>	
Composition en acides aminés	Thr, 0,93 (1) ; Glx, 2,05 (2) ; Pro, 1,99 (2) ; Val, 0,97 (1) ; Tyr, 0,66 (1) ; Phe, 1,00 (1) ; Arg, 0,99 (1).
● <i>Peptide $\beta DT6a$</i>	
Composition en acides aminés	Asx, 2,00 (1-2) ; Thr, 1,59 (1-2) ; Ser, 3,58 (4) ; Glx, 6,89 (7) ; Pro, 2,10 (1-2) ; Gly, 1,58 (1) ; Val, 1,89 (2) ; Ile, 1,89 (2) ; Leu, 2,32 (3) ; Lys, 1,02 (1) ; Arg, 0,84 (1).
Carboxypeptidases B et A	(CPB : 2 μ l ; 20 h) (CPA : 2 μ l ; 20 h). Thr, 0,40 ; Ser, 0,26 ; Gly, 0,32 ; Ile, 0,44 ; Arg, 0,82.
● <i>Peptide $\beta DT6aPaT2$</i>	
Composition en acides aminés	Asx, 1,09 (1) ; Ser, 2,12 (2) ; Glx, 2,90 (3-5) ; Pro, 1,46 (1) ; Gly, 0,93 (1) ; Val, 1,31 (2) ; Ile, 0,71 (1) ; Leu, 2,03 (2) ; Lys, 0,65 (1).
Casboxypeptidases B et A	(CPA : 2 μ l ; CPB : 2 μ l ; 40°C ; 18 heures ; pH 8,5) Lys, 1,00 ; Ser, 1,56 ; Leu, 0,94.
● <i>Peptide $\beta DT6aPaT5$</i>	
Composition en acides aminés	Thr, 0,75 (1) ; Ser, 1,33 (2) ; Glx, 1,29 (1-2) ; Ile, 1,00 (1) ; Arg, 1,25 (1).

Les travaux précédemment effectués par notre équipe sur la caséine β bovine avaient porté, entre autres, sur les peptides obtenus par hydrolyse de cette caséine par le bromure de cyanogène : le site de la substitution d'acides aminés différenciant les variants βA^1 et βA^2 [substitution 67 Pro (βA^2) \rightarrow His (βA^1)] avait été localisé

dans le peptide NH₂-terminal, β -CNI, qui comporte 93 résidus d'acides aminés (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a). Ce peptide peut être obtenu facilement, soit par simple dialyse de l'hydrolysate CNBr, soit par chromatographie de cet hydrolysate sur colonne de Sephadex G-50 en milieu acide ; on le trouve alors dans le premier pic du chromatogramme (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1970).

Nous avons, dans un premier temps, vérifié par électrophorèse en gel d'amidon avec urée, à pH 3,0, que la fraction $\beta A^1/A^2$ CNI de zébu contenait deux peptides dont la mobilité électrophorétique était celle des peptides bovins βA^1 CNI et βA^2 CNI. Ce résultat conduisait donc à rechercher, chez le Zébu également, la substitution différenciant βA^1 et βA^2 dans le peptide CNI.

Environ 30 μ Moles du peptide $\beta A^1/A^2$ CNI de zébu ont alors été hydrolysées par la trypsine (E/S : 1/100 ; 40°C ; 3 heures ; pH 8), et l'hydrolysate ainsi obtenu a été chromatographié sur colonne de Dowex AG 50 WX 2 selon un protocole expérimental identique à celui qui avait été suivi pour l'étude du peptide βA^2 CNI bovin (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1971). Les peptides figurant dans les différentes fractions de cette chromatographie ont été repurifiés par électrophorèse ou chromatographie préparative sur papier : leur composition en acides aminés s'est avérée identique à celle des peptides homologues de βA^2 , y compris celle du peptide βA^2 CNI T4 formé des résidus 49 à 68 inclus, qui comprend, chez les bovins le site de la substitution $\beta A^2 \rightarrow \beta A^1$ (position 67). Par contre, le peptide homologue de ce dernier dans βA^1 n'a pu être retrouvé dans cette chromatographie.

Pour retrouver ce dernier peptide, 5 μ Moles du peptide $\beta A^1/A^2$ CNI de zébu ont été hydrolysées par la trypsine (E/S : 1/50 ; 1 heure ; 40°C ; pH 8,0) après maléylation (GROSCLAUDE *et al.*, 1970). L'hydrolysate ainsi obtenu a ensuite été chromatographié, après démaléylation, sur colonne de Sephadex G-50 en milieu acide acétique 30 vol. p. 100. La seconde fraction du chromatogramme contenait essentiellement un peptide, $\beta A^1/A^2$ CNI Tmz, donnant au réactif de Pauly une coloration indiquant la présence de tyrosine et d'histidine. Cette fraction a alors été hydrolysée par la thermolysine, (E/S : 1/50 ; 1 heure ; 40°C ; pH 8), et l'hydrolysate ainsi obtenu, chromatographié sur colonne de Sephadex G-25 en milieu acide acétique 30 vol. p. 100. La seconde fraction du chromatogramme contenait entre autres, un peptide colorable au réactif de Pauly (présence d'histidine et tyrosine), qui a été séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9. La composition de ce peptide, βA^1 CNI Tmz Thzd, donnée dans le tableau 5, est celle du segment 59 à 68 dans la séquence de la caséine βA^1 bovine ; l'action de la carboxypeptidase A (tabl. 5) confirme la présence d'un résidu histidyle en avant-dernière position. Ces résultats indiquent donc bien que les variants βA^1 et βA^2 diffèrent chez le Zébu par la même substitution, 67 Pro (βA^2) \rightarrow His (βA^1), que chez les bovins.

2. 3. Variants α_{s1} -C et βA^1 contrôlés par la combinaison allélique α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1}.

Nous avons utilisé, pour l'étude des variants α_{s1} -C et βA^1 contrôlés par la combinaison allélique α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1}, un mélange de petits échantillons de phénotype α_{s1} -C, $\beta A^1/A^2$. En effet aucun des 11 échantillons de caséine dont nous disposions en quantité assez importante n'était de phénotype α_{s1} -C, βA^1 ou α_{s1} -C, $\beta A^1/A^2$; d'autre part nous disposions de trop faibles quantités de caséines de phénotype α_{s1} -C, βA^1 (3 petits échantillons seulement).

La caséine α_{s1} -C a été préparée à partir de 1 g de mélange, en quantités sensiblement égales, de 20 échantillons de « caséines entières » possédant ce phénotype. Le peptide α_{s1} -C CNIT₁, qui correspond au segment 152 à 193 de la chaîne polypeptidique de la caséine α_{s1} -C a été préparé en suivant, pour l'essentiel, le même protocole expérimental que celui de MERCIER *et al.* (1970 *b*).

L'hydrolyse de ce peptide par les carboxypeptidases B et A (peptide : 0,037 μ M CPB : 2 μ l ; CPA : 2 μ l ; 40°C : 3 heures ; pH 8,5) libère de la lysine (0,98) et de la glycine (0,81). Ceci confirme que l'allèle α_{s1} -Cn^c figurant dans la combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} détermine bien le variant α_{s1} C classique, caractérisé par la présence d'un résidu glycyle en position 192 de la chaîne polypeptidique.

La caséine $\beta A^1/A^2$ a été préparée à partir de 2 g d'un mélange, en quantités sensiblement égales, de 10 échantillons individuels de « caséine entière », possédant toujours le phénotype α_{s1} -C, $\beta A^1/A^2$. Nous avons alors suivi pour l'analyse de cette préparation le même protocole expérimental que celui qui nous avait permis de préparer précédemment le peptide $\beta A^1/A^2$ CNITm₂Th₂d (voir paragraphe 22).

Ce travail nous a permis d'obtenir un peptide de composition identique à celle de $\beta A^1/A^2$ CNITm₂Th₂ (tabl. 5) et libérant également, par action de la carboxypeptidase A, de l'asparagine et de l'histidine. L'allèle β -Cn^{A1} figurant dans la combinaison allélique α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} détermine donc bien le variant βA^1 classique, caractérisé par la présence d'un résidu histidyle en position 67 de la chaîne polypeptidique.

En conclusion, la combinaison allélique α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} peut bien être considérée comme dérivant par recombinaison des combinaisons α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A1} et α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A2}.

2. 4. Variants κA et κB .

Les investigations sur la caséine κA de zébu ont été répétées — nous en verrons la raison plus loin — sur deux préparations différentes de caséine κA_1 , provenant de sujets tous deux homozygotes pour la combinaison allélique α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A2}— κ -Cn^A, mais élevés dans des régions différentes (région 1 et 3 sur la fig. 1). La caséine κB_1 de Zébu a été préparée à partir du lait d'un sujet homozygote pour la combinaison allélique α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A2}— κ -Cn^B.

Chez les bovins, la différence de mobilité électrophorétique des variants κA et κB est due à la substitution 148 Asp (κA) \rightarrow Ala (κB), localisée dans le peptide κ CN₂, l'un des trois peptides obtenus par hydrolyse de la caséine κ par le bromure de cyanogène ; ce peptide représente la partie COOH-terminale de la caséine κ , et correspond au « caséino-macropéptide » amputé de son résidu méthionyle NH₂-terminal ; les peptides κA_1 CN₂ et κB_1 CN₂ diffèrent en outre par une seconde substitution 136 Thr (κA) \rightarrow Ile (κB) qui n'affecte pas, évidemment, la charge globale de la molécule (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 *b*).

Les peptides κA_1 CN₂ et κB_1 CN₂ de zébu ont été préparés par chromatographie sur colonne de Dowex AG 50 WX 2 selon MERCIER *et al.* (1972). Les compositions en acides aminés obtenues pour ces peptides n'étaient pas très satisfaisantes, mais indiquaient toutefois, que, comme chez les bovins, le peptide κA_1 CN₂ de zébu possède un résidu Asx de plus que le peptide κB_1 CN₂. Ce résultat nous a incités à procéder, dans un premier temps, à une étude détaillée du peptide κA_1 CN₂ de zébu.

Ce peptide (10 μ Moles) a été hydrolysé par la thermolysine (E/S : 1/200 ; 1 heure ; 40°C ; pH 8,0) et l'hydrolysate ainsi obtenu, chromatographié sur colonne de Dowex AG 50 WX 2 en suivant le même protocole que pour les bovins (MERCIER *et al.*, 1972 ; GROSCLAUDE *et al.*, 1972 *b*). Tous les peptides obtenus ont été repurifiés, soit sur colonne de Sephadex G-10 à G-25, soit par électrophorèse ou chromatographie préparative sur papier.

La première fraction du chromatogramme contenait le peptide αA_1CN_2ThI dont la composition (tabl. 6) est identique à celle du peptide αA_1CN_2ThI bovin, correspondant à l'élément de séquence formé des résidus 146 à 161 (fig. 2). Recoupé de manière plus poussée par la thermolysine, (E/S : 1/50 ; 4 heures ; 40°C ; pH 8,5), αA_1CN_2ThI se scinde en deux peptides dont l'un, αA_1CN_2ThIa , de migration anodique, a été préparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 4,7. La compo-

TABLEAU 6

Caséine α	
• Peptide αA_1CN_2ThI	
Composition en acides aminés	Asx, 1,75 (2) ; Thr, 0,88 (1) ; Ser, 1,58 (2) ; Glx, 4,20 (4) ; Pro, 2,95 (3) ; Val, 0,88 (1) ; Ile, 1,70 (2) ; Leu, 0,83 (1).
• Peptide αA_1CN_2ThIa	
Composition en acides aminés	Asx, 0,91 (1) ; Ser, 1,00 (1) ; Glx, 2,04 (2) ; Pro, 0,67 (1) ; Leu, 0,72 (1).
• Peptide $\alpha A_1CN_2Th_2$	
Composition en acides aminés	Thr, 1,90 (2) ; Ser, 1,68 (2) ; Pro, 1,94 (2) ; Glx, 1,27 (1) ; Gly, 0,95 (1) ; Ala, 1,00 (1) ; Ile, 1,03 (1).
Hydrazinolyse	Pro, 0,23.
• Peptide $\alpha A_1CN_2Th_5a$	
Composition en acides aminés	Thr, 0,76 (1) ; Glx, 1,00 (1) ; Ile, 1,00 (1).
Leucine aminopeptidase	(2 μ l ; 1/2 h) Ile, 0,76.
Edman après Leucine aminopeptidase	Thr, 0,18 (0) ; Glx, 0,78 (1).
• Peptide $\alpha A_1CN_2Th_5b$	
Composition en acides aminés	Thr, 0,87 (1) ; Glx, 1,11 (1) ; Ala, 0,95 (1) ; Ile, 1,00 (1).
Leucine aminopeptidase	(2 μ l ; 1/2 h) Ile, 0,55.
• Peptide αB_1CN_2ThI	
Composition en acides aminés	Asx, 1,00 (1) ; Thr, 0,91 (1) ; Ser, 1,61 (2) ; Glx, 4,11 (4) ; Pro, 3,18 (3) ; Ala, 1,02 (1) ; Val, 0,81 (1) ; Ile, 1,65 (2) ; Leu, 0,93 (1).
Edman : Stade 1	Asx, 0,92 (1) ; Thr, 0,99 (1) ; Ser, 2,17 (2) ; Glx, 4,34 (4) ; Pro, 2,67 (3) ; Ala, 0,86, (1) ; Val, non dosé ; Ile, 1,65 (2) ; Leu, 0 (0).
Stade 2	Asx, 1,06 (1) ; Thr, 0,80 (1) ; Ser, 2,13 (2) ; Glx, 4,00 (3-4) ; Pro, 3,00 (3) ; Ala, 0,93 (1) ; Val, 0,67 (1) ; Ile, 1,70 (2).
Stade 3	Asx, 1,00 (1) ; Thr, 0,83 (1) ; Ser, 2,00 ; Glx, 3,44 (3-4) ; Pro, 2,83 (3) ; Ala, 0,55 (0-1) ; Val, 0,65 (1) ; Ile, 1,63 (2).
• Peptide $\alpha B_1CN_2Th_2$	
Composition en acides aminés	Thr, 2,60 (3) ; Ser, 1,60 (2) ; Glx, 1,18 (1) ; Pro, 2,13 (2) ; Gly, 1,18 (1) ; Ala, 1,02 (1) ; Ile, 0,87 (1).
Leucine aminopeptidase M	(Solution à 2 mg/ml : 100 μ l ; 24 heures ; 40°C ; pH 8) Ile, 0,64 ; Ala, 0,64 ; Ser, 0,60 ; Gly, 0,76 ; Thr, 0,72.
• Peptide $\alpha B_1CN_2Th_8$	
Composition en acides aminés	Glx, 1,08 (1) ; Ala, 1,03 (1) ; Ile, 0,89 (1).
Edman : Stade 1	Glx, 1,02 (1) ; Ala, 1,00 (1) ; Ile, 0 (0).

sition de ce peptide, ainsi que le fait qu'il libère de la phosphosérine par hydrolyse acide ménagée, indiquent qu'il correspond à l'élément de séquence formé des résidus 146 à 151 : ceci a été confirmé par l'établissement de sa séquence par spectrométrie de masse, après déphosphorylation.

La seconde fraction du chromatogramme contenait le peptide $\alpha A_1 CN_2 Th_2$ dont la composition (tabl. 5) correspond à celle de l'élément de séquence formé des résidus 125 à 134. La cinquième fraction nous a fourni deux peptides séparés par électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9, $CN_2 Th_5a$ et $CN_2 Th_5b$, qui correspondent visiblement (tabl. 6 et fig. 2) à l'élément de séquence formé des résidus 135 à 137 pour le premier, et 135 à 138 pour le second. Toutes les autres fractions nous ont donné des peptides de composition identique à celle des peptides bovins obtenus dans les mêmes conditions, ce qui nous a permis de reconstituer le peptide $\alpha A_1 CN_2$.

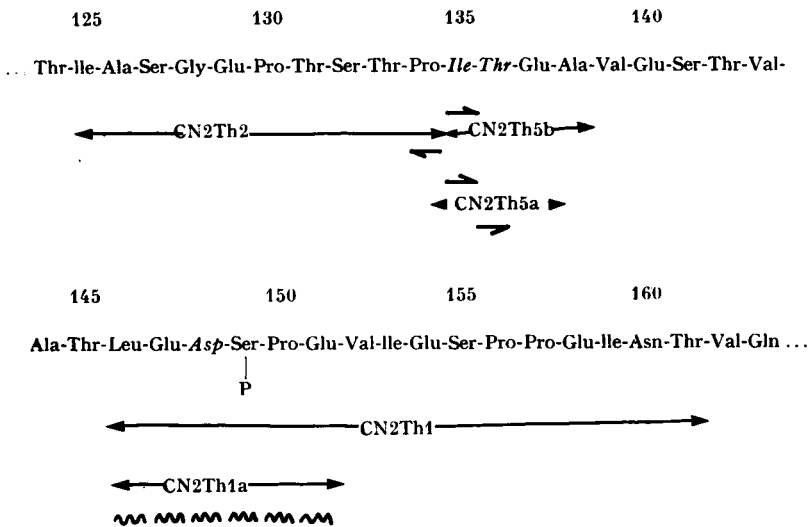


FIG. 2. — Élément de la structure primaire du caséino-macropéptide du variant αA de zébu. Les différences observées avec le variant αB de zébu sont indiquées en italiques.

↔ : peptide cité dans le texte ; → : acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase ;
 ← : acide aminé identifié par la technique soustractive d'Edman ; ↔ : acide aminé identifié par hydrazinolyse ; ~ : séquence établie par spectrométrie de masse

En définitive, ces résultats prouvaient que le variant αA de zébu comportait bien, comme son homologue bovin, un résidu aspartyle en position 148 ; mais ils révélaient aussi qu'un résidu isoleucyle se trouvait en position 135 dans le variant αA de zébu que nous avons étudié, au lieu d'un résidu thréonyle dans les variants αA et αB bovins. Cette dernière observation pouvait paraître troublante, quand on la rapprochait du fait que les variants αA et αB bovins diffèrent, outre la substitution 148 Asp (αA) → Ala (αB) par une substitution 136 Thr (αA) → Ile (αB). Nous avons donc répété cette partie de notre travail sur un second échantillon de caséine αA_1 de zébu, provenant d'un lait prélevé dans une toute autre région que le précédent : les résultats obtenus sur ce second échantillon confirment en tous points les précédents.

L'étude du peptide κB_1CN_2 , menée selon un protocole expérimental identique au précédent, nous a notamment permis d'obtenir les peptides suivants :

— le peptide $\kappa B_1CN_2Th_1$, dont la composition (tabl. 6) correspond à celle de l'élément de séquence formé des résidus 146 à 161. Comme l'indiquent les résultats de la dégradation soustractive d'Edman, le troisième résidu à partir de l'extrémité NH_2 -terminale de ce peptide (position 148 dans la chaîne polypeptidique) est un résidu alanyle, au lieu d'un résidu aspartyle dans le variant κA bovin (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 b) ou zébu (ci-dessus).

— les peptides $\kappa B_1CN_2Th_2$ et $\kappa B_1CN_2Th_8$, qui correspondent respectivement aux éléments de séquence formés des résidus 125 à 135 et 136 à 138. L'action de la LAP M sur $\kappa B_1CN_2Th_2$ confirme que le résidu 135 est un résidu thréonyle ; un stade de dégradation soustractive d'Edman montre qu'un résidu isoleucyle se trouve en position NH_2 -terminale dans $\kappa B_1CN_2Th_8$.

De manière générale, l'ensemble des résultats obtenus sur le peptide κB_1CN_2 de zébu ne permet de déceler aucune différence avec son homologue bovin.

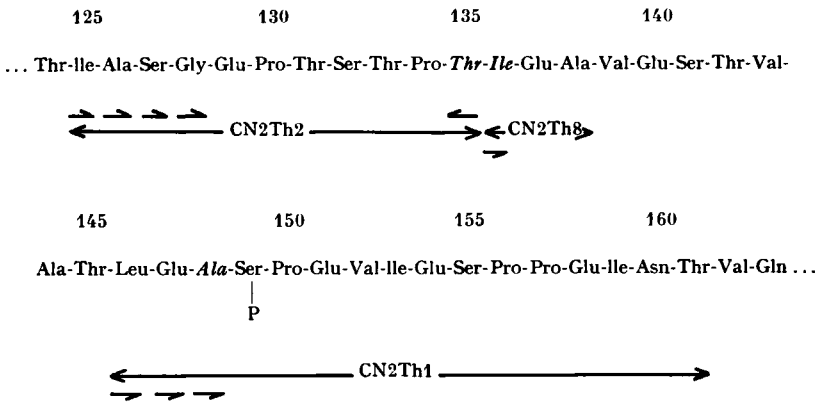


FIG. 3. — Élément de la structure primaire du caséino-macropéptide du variant κB de zébu

Les différences observées avec le variant κA de zébu sont indiquées en italiques

↔ : peptide cité dans le texte ; → et ← : acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase M ;
 → : acide aminé identifié par la technique soustractive d'Edman

En définitive la différence de charge nette entre les variants κA et κB est donc imputable, chez le Zébu comme chez les bovins, à une substitution 148 Asp (κA) → Ala (κB). Par ailleurs, comme chez les bovins, les caséino-macropéptides des variants κA et κB de zébu diffèrent par une seconde substitution, 136 Thr (κA) → Ile (κB) qui n'affecte pas la charge globale de ces variants. Mais en outre, nous avons décelé, entre les caséino-macropéptides des variants κA et κB de zébu une troisième substitution, 135 Ile (κA) → Thr (κB), également sans effet sur la charge globale, et qui n'a pas été signalée jusqu'à présent chez les bovins.

2. 5. Variant βB .

Absent dans notre échantillon de population de zébus malgaches, le variant βB a été préparé à partir du lait d'une vache zébu de race *Choa*, provenant de la Répu-

blique tchadienne (GROSCLAUDE et QUEVAL, 1973), homozygote pour la combinaison allélique $\alpha_{s1}\text{-Cn}^B\text{-}\beta\text{-Cn}^B\text{-}\chi\text{-Cn}^A$.

Nous avons établi précédemment que, chez les bovins, le variant βB diffère du variant βA^1 par la substitution I22 Ser (βA^1) \rightarrow Arg (βB) (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a). Cette substitution se traduit, en particulier, par l'apparition, dans les fingerprints tryptiques de βB , d'un peptide supplémentaire qui réagit avec la ninhydrine en donnant une coloration brune très caractéristique (BRIGNON *et al.*, 1971). Ce peptide ($\beta\text{BT}14a$), correspond dans la chaîne polypeptidique de la caséine βB bovine aux résidus I14 à I22.

Environ 10 μMoles de caséine βB de zébu ont été hydrolysées par la trypsine (E/S : 1/100 ; 40°C ; 2 heures ; pH 7,8). Le fingerprint de cet hydrolysate révélant la présence, après coloration à la ninhydrine, d'un peptide brun occupant la même position que le peptide bovin $\beta\text{BT}14a$, la totalité de l'hydrolysate a été chromatographiée sur une colonne de Sephadex G-50 en milieu acide acétique 30 vol. p. 100. Le peptide brun qui se retrouve dans la quatrième fraction du chromatogramme a été repurifié par une chromatographie préparative sur papier, suivie d'une électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9 (4 500 volts ; 20 mm). Sa composition en acides aminés, donnée dans le tableau 5 est identique à celle du peptide bovin $\beta\text{BT}14a$, ce qui prouve que, chez le Zébu, le variant βB diffère du variant βA^1 , par la même substitution que chez les bovins [I22 Ser (βA^1) \rightarrow Arg (βB)].

2. 6. Variant βD .

Absent, comme βD , de notre échantillon de population de zébus malgaches, le variant βD a été préparé à partir de deux petits échantillons de lait (30 ml chacun) provenant de métis yak \times zébu népalais, de génotype $\alpha_{s1}\text{-Cn}^c/\alpha_{s1}\text{-Cn}^c$, $\beta\text{-Cn}^A/\beta\text{-Cn}^D$ et $\chi\text{-Cn}^A/\chi\text{-Cn}^A$; dans ces deux génotypes, l'allèle $\beta\text{-Cn}^D$ est d'origine zébu (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a). La caséine βD a été purifiée, à partir du mélange $\beta\text{A}^2\text{D}$, par une simple chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (MERCIER *et al.*, 1968), avec la même facilité qu'à partir du mélange βBD (THOMPSON *et al.*, 1969).

THOMPSON *et al.* (1969) ont donné, du variant βD , une composition en acides aminés et en phosphore que nous avons interprétée d'une autre manière que ne l'ont fait ces auteurs : nous avons comparé βD non pas à βB et βC , mais à βA^2 : associé à $\alpha_{s1}\text{-Cn}^c$, l'allèle $\beta\text{-Cn}^D$ nous a semblé en effet, plutôt dériver de βA^2 . Dans cette optique la composition en acides aminés donnée par THOMPSON *et al.* (1969) fait surtout apparaître que, par rapport à βA^2 , βD possède un résidu lysyle en plus et un à deux groupements phosphates en moins. Ceci incitait à rechercher dans les phosphopeptides de βD l'altération qui différencie ce variant de βA^2 .

Nous avons donc, à partir d'un hydrolysate de 4 μMoles de caséine βD (E/S : 1/50 ; 40°C ; 2 heures 30 ; pH 8,6) tenté de purifier les peptides tryptiques de ce variant en adoptant exactement le protocole expérimental suivi pour les peptides de la caséine β bovine (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1970) et qui comporte une chromatographie sur résine Dowex AG 50 WX2, suivie de repurifications, soit sur colonne de Sephadex, soit par chromatographie ou électrophorèse préparatives sur papier.

Ce travail ne nous a pas permis de retrouver tous les peptides de la caséine βD . Cependant outre les peptides de composition identique à celle des peptides bovins T1, T2, T3A (contenant également un résidu phosphoséryle dans βD), T4, T5, T6, T11,

T12 et T14, nous avons obtenu, à partir de la sixième fraction de la chromatographie sur colonne de Dowex, le peptide β DT6a, repurifié par chromatographie sur colonne de Sephadex G-25 en milieu acide acétique 30 vol. p. 100, et dont la composition en acides aminés est donnée dans le tableau 5. Cette composition, ainsi que le fait que β DT6a libère, par hydrolyse acide ménagée, plusieurs phosphosérines (moyenne de 2 mesures : 3,1) indiquent que ce peptide représente la partie NH_2 -terminale de la caséine β D (fig. 4). Dans cette hypothèse, les teneurs obtenues pour plusieurs résidus

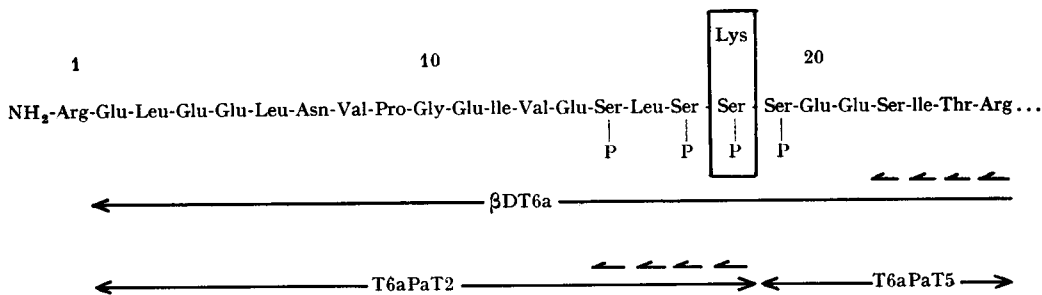


FIG. 4. — Localisation, dans la partie NH_2 -terminale de la caséine β , de la substitution d'acides aminés différenciant les variants βA^* et βD . La séquence de référence est celle du variant βA^* (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972). La substitution différenciant βA^* et βD est encadrée

↔ : peptide cité dans le texte ; ← : acide aminé libéré par les carboxypeptidases B ou A (après déphosphorylation pour T6aPaT2)

(Asx, Thr, Pro, Gly) sont cependant trop élevées, ce qui peut être dû à la présence d'une impureté, décelable par électrophorèse sur papier, mais que nous n'avons pas tenté d'éliminer, compte tenu de la faible quantité de peptide disponible. D'autre part, la présence, dans le peptide β DT6a, d'un résidu lysyle, et l'absence, par rapport au peptide NH_2 -terminal bovin ($\beta\text{A}^*\text{T1}$) d'un résidu arginyle peuvent s'interpréter *a priori* de plusieurs manières. Tenant compte d'observations antérieures indiquant que le résidu arginyle NH_2 -terminal pouvait être libéré par la trypsine (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1970 ; GROSCLAUDE et MAHE, 1971), nous avons retenu cette hypothèse, et supposé, puisque β DT6a comportait un résidu phosphoséryle de moins que $\beta\text{A}^*\text{T1}$, que les variants βA^* et βD différaient par une substitution Ser P → Lys, se traduisant par l'introduction, dans le variant βD , d'une liaison Lys-Ser P, non hydrolysable par la trypsine sans déphosphorylation préalable du peptide.

Environ 1 μ mole de peptide β DT6a a donc été hydrolysée successivement par la phosphatase alcaline (5 μ l ; 40°C ; 24 heures ; pH 8,6) puis par la trypsine (E/S : 1/50 ; 40°C ; 3 heures ; pH 8,6). L'électrophorèse à pH 1,9 de cet hydrolysat indique la présence de 6 fractions différentes et en quantités inégales (certaines provenant de l'impureté contaminant β DT6a). La composition en acides aminés des peptides obtenus, après électrophorèse préparative, par élution de 2 fractions principales (β DT6aPaT2 et β DT6aPaT5) est donnée dans le tableau 5.

Si l'on fait abstraction du fait que les quantités d'acide glutamique trouvées pour ces peptides sont inférieures à celles qui sont attendues dans cette hypothèse,

ces deux peptides paraissent bien résulter de l'hydrolyse d'un peptide homologue de $\beta A^2 T_1$, mais amputé du résidu arginyle NH_2 -terminal et comportant en position 18, un résidu lysyle au lieu du résidu séryle. L'action des carboxypeptidases A et B sur βDT_6a et $\beta DT_6a PaT_2$ donne des résultats tendant à confirmer cette hypothèse.

Ce travail, quoique imparfait, indique donc que le variant βD diffère du variant βA^2 par la substitution 18 P $^{Ser}(\beta A^2) \rightarrow$ Lys (βD). Une telle substitution rend parfaitement compte de la mobilité électrophorétique de βD , tant en milieu acide qu'en milieu alcalin ; compte tenu également de la composition en acides aminés donnée par THOMPSON *et al.* (1969) il est très vraisemblable que cette substitution est seule responsable de la différence de charge globale entre βA^2 et βD .

DISCUSSION

Les techniques d'électrophorèse, utilisées pour détecter le polymorphisme génétique des protéines, sont assez peu discriminantes. On peut calculer en effet que, dans le cas général, le tiers seulement des mutations ponctuelles du locus de structure d'une protéine se traduisent par une altération de la charge globale de cette protéine, proportion valable, en particulier, pour les caséines bovines (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a) ; de plus, une même altération de la charge globale peut être obtenue par mutation de plusieurs, voire de nombreux sites du locus de structure. L'emploi des termes de « variants génétiques » consacré par l'usage pour désigner les variants électrophorétiques d'une protéine, est donc très ambigu, puisqu'un variant électrophorétique peut représenter tout un ensemble de variants génétiques, ou mutants, de cette protéine.

De ces considérations découlent, pour l'analyse biochimique du polymorphisme électrophorétique d'une protéine, certaines conséquences pratiques :

— On peut attendre, en premier lieu, que l'étude biochimique des variants électrophorétiques d'une protéine conduise parfois à déceler d'autres altérations de structure primaire que celles qui sont responsables des différences de mobilité électrophorétique qui font distinguer ces variants. Cependant, la mise en évidence d'altérations n'ayant pas d'effet sur la charge globale est, dans ces conditions, tout à fait aléatoire ; tant qu'on ne dispose pas de techniques permettant d'en faire un inventaire systématique dans les populations, il n'est donc pas judicieux de les placer sur le même plan que les altérations dont l'étude systématique peut être faite par électrophorèse. Dans cet ordre d'idées, le fait que les caséinomacropeptides des variants de type κA dont nous avons étudié la structure primaire chez les bovins et les zébus diffèrent par une substitution 135 Thr (κA bovin) \rightarrow Ile (κA zébu) représente sans doute un résultat intéressant : cependant, faute d'une étude systématique, rien ne permet d'affirmer que les deux variants ainsi mis en évidence sont effectivement confinés l'un chez *Bos taurus*, l'autre chez *Bos indicus*.

— On ne peut affirmer, en second lieu, tant que l'étude biochimique n'en a pas été menée à terme, que la différence de mobilité entre deux variants électrophorétiques dérive, dans toutes les populations où l'on trouve ces derniers, voire même au sein d'une population, d'un seul événement mutational. C'est ainsi que la plupart des conclusions des études comparatives publiées jusqu'ici sur le

polymorphisme des protéines de lait de bovins et de zébus étaient sujettes à caution puisque l'identité des variants électrophorétiques communs aux deux sous-genres n'avait pas été démontrée.

Le fait, mis en évidence par ce travail, que tous les variants électrophorétiques communs à *Bos taurus* et à *Bos indicus* (α_{s1} -B et C ; βA^1 , A^2 et B ; γA et B) diffèrent, dans les deux cas, par les mêmes substitutions d'acides aminés, constitue donc un résultat fondamental qui révèle de manière très concrète la parenté des bovins et des zébus ; dans le cas particulier du variant βB notre travail conduit donc à renoncer à désigner le variant de zébu par une notation particulière (βBz), puisque nous n'avons pas à tenir compte, nous l'avons vu plus haut, des altérations sans effet sur la charge, dont l'existence est suggérée par la seule analyse biochimique d'un petit nombre d'échantillons (ASCHAFFENBURG *et al.*, 1968 ; THOMPSON *et al.*, 1969).

L'existence de variants communs à *Bos taurus* et à *Bos indicus* pose un problème d'histoire des bovinés. Selon EPSTEIN (1971), le foyer d'origine des zébus se trouve en Asie du sud-ouest, en bordure est du grand désert salé d'Iran ; deux types différents de zébus auraient été successivement sélectionnés dans cette région à partir de bovins à longues cornes : un type à bosse cervico-thoracique, vers le quatrième millénaire avant notre ère, et un type à bosse thoracique vers le troisième millénaire. Or la domestication des bovins qui sont à l'origine des races Africaines actuelles, et qui seraient aussi, au moins en partie, à l'origine des races européennes, aurait également eu lieu en Asie du sud-ouest (Mésopotamie, Elam) vers les cinquième et troisième millénaires avant notre ère. On peut donc supposer que le polymorphisme commun aux bovins et aux zébus de notre époque existait déjà plusieurs millénaires avant notre ère dans les populations bovines d'Asie du sud-ouest. Pour expliquer le contraste entre la prédominance, au locus α_{s1} -Cn, de l'allèle α_{s1} -Cn^B dans toutes les populations bovines et celle de l'allèle α_{s1} -Cn^C dans toutes les populations de zébus, on peut remarquer que la domestication des bovins et des zébus a sans doute été effectuée, à l'origine, en effectifs limités, ce qui a donné prise au jeu de la dérive génétique.

Les variants et les combinaisons alléliques de *Bos taurus* et de *Bos indicus* peuvent donc être regroupés en un arbre phylogénétique commun très cohérent (fig. 5) dans lequel il resterait cependant à désigner, entre α_{s1} -Cn^B— β -Cn^A et α_{s1} -Cn^C— β -Cn^A, la combinaison allélique originelle. La connaissance de la nature du résidu occupant, dans la chaîne de caséine α_{s1} d'espèces voisines, la position homologue du résidu 192 de la caséine α_{s1} de bovins ou de zébus pourra peut-être à l'avenir permettre d'avancer une hypothèse. Quoiqu'il en soit, la figure 5 permet d'illustrer une notion d'un intérêt tout à fait général et méritant réflexion dans le cadre de l'analyse phylogénétique des populations animales : celle de l'échelonnement dans le temps des événements mutationnels qui sont à l'origine des variants actuellement détectés. C'est ainsi que, si βA^2 est bien le variant originel du locus β -Cn, βA^1 est alors, selon toute vraisemblance, plus ancien que βB et βC ; on conçoit aussi qu'à côté des variants les plus anciens, communs aux bovins et aux zébus, d'autres variants soient apparus dans les deux sous-genres après leur divergence phylogénétique : ceci pourrait être le cas par exemple, au locus β -Cn, des variants βD chez le zébu et βA^3 chez les bovins.

L'absence des variants βB et βD dans un échantillon pourtant assez important de

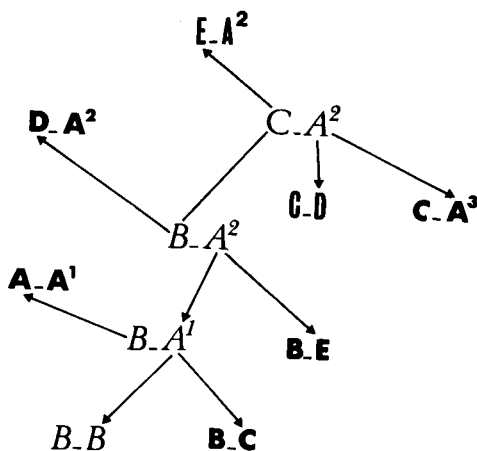


FIG. 5. — Phylogénie des combinaisons alléliques du couple $\alpha_{s1}\text{-Cn}\text{-}\beta\text{-Cn}$ chez les bovins et les zébus, à l'exclusion des combinaisons recombinantes.

Pour $C\text{-}A^2$, lire $\alpha_{s1}\text{-Cn}^C\text{-}\beta\text{-Cn}^{A^2}$, etc. Les diverses combinaisons dérivent les unes des autres par mutation, soit au locus $\alpha_{s1}\text{-Cn}$ soit au locus $\beta\text{-Cn}$ (flèches). On ne peut encore désigner, entre $\alpha_{s1}\text{-Cn}^B\text{-}\beta\text{-Cn}^{A^2}$ et $\alpha_{s1}\text{-Cn}^C\text{-}\beta\text{-Cn}^{A^2}$, la combinaison originelle. En italiques : combinaisons communes aux bovins et aux zébus ; en caractères gras : combinaisons n'ayant été trouvées que chez des bovins ; la combinaison $\alpha_{s1}\text{Cn}^C\text{-}\beta\text{-Cn}^D$ n'a été trouvée que chez des zébus ; sur ce schéma figure également la combinaison $\alpha_{s1}\text{-Cn}^B\text{-}\beta\text{-Cn}^{A^2}$, découverte récemment chez des yaks (*Bos poëphagus*) au Népal (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a).

la population de zébus du nord-ouest et du sud de Madagascar est une observation intéressante que l'on peut être tenté de rapprocher de la conception précédemment émise selon laquelle βB et βD sont des variants d'apparition plus récente que βA^1 . On sait malheureusement peu de choses de l'origine du zébu malgache. Selon VERIN (1967, 1972) on trouve des ossements de zébus dans certains gisements sub-fossilières les plus anciens de l'île. EPSTEIN (1971) résume ainsi ses conclusions : « Avant le milieu du premier millénaire de notre ère, tous les immigrants à Madagascar étaient de race et de culture malaisiennes ; ces immigrants semblent avoir introduit dans l'île le Zébu à bosse thoracique à partir de l'Inde ou du sud de l'Arabie. Vers le début du second millénaire, les premiers immigrants malaisiens ont été rejoints par des Indonésiens mêlés d'éléments Hamitiques ou Bantous de la côte azanienne ⁽¹⁾, et par des Bantous de la côte est africaine. Avec ces immigrants, un type de bétail sans corne ainsi que du bétail Sanga... atteignirent Madagascar ». Ceci signifie que le peuplement en zébu de l'île s'est fait à partir de plusieurs apports successifs, dont certains très anciens, sans que l'on puisse préciser l'importance respective de ces divers apports. Il est clair en tous cas qu'une étude approfondie du polymorphisme des lactoprotéines dans les races d'Afrique et d'Asie du sud-ouest serait du plus haut intérêt, ainsi que des investigations dans d'autres régions de Madagascar que celles que nous avons visitées.

Le linkage étroit existant entre les loci $\alpha_{s1}\text{-Cn}$, $\beta\text{-Cn}$ et $\kappa\text{-Cn}$ se traduit, dans les races bovines — françaises par exemple — par un « déséquilibre de linkage » très

(1) Nom donné, dans l'Antiquité, à la côte est-africaine, de Chisimaio (Somalie) à Kilwa (Tanganyika).

accusé, toujours statistiquement significatif entre les allèles des loci α_{s1} -Cn et β -Cn, et en général significatif entre les allèles des loci α_{s1} -Cn et α -Cn d'une part, et β -Cn et α -Cn d'autre part (GROSCLAUDE, 1974). Entre les allèles des loci α_{s1} -Cn et β -Cn, le déséquilibre, particulièrement accusé, se traduit par l'absence ou l'extrême rareté des combinaisons alléliques recombinantes. C'est ainsi que la combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} n'a pas encore été observée dans les 10 races françaises étudiées jusqu'ici (environ 3 000 analyses au total ; GROSCLAUDE, 1974). Le présent travail indique que l'on peut déceler, chez le Zébu malgache, un déséquilibre de linkage semblable à celui qui existe dans les populations bovines françaises ; toutefois ce déséquilibre paraît moins accusé, et ceci se traduit en particulier, par l'existence chez le Zébu malgache, à côté des combinaisons α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A2}, α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A1} et α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A2}, de la combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} ; en démontrant que les substitutions d'acides aminés différenciant α_{s1} -B d' α_{s1} -C et β A¹ de β A² étaient les mêmes quelle que soit la combinaison allélique considérée, nous avons démontré que cette combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} pouvait bien être considérée comme un recombinant.

De manière générale, on sait que la probabilité de fixation d'un recombinant dans une population, dépend de la valeur prise dans cette population par l'expression Ne , N étant l'« effectif génétique » de la population, et e le taux d'apparition du recombinant (OHTA et KIMURA, 1971) ; ce dernier est le produit du taux de recombinaison intrinsèque entre les deux sites ségrégeant et de la probabilité du double hétérozygote : or on peut vérifier que celle-ci est actuellement du même ordre de grandeur chez le Zébu malgache et dans des races bovines françaises bien étudiées telles que la *Montbéliarde* et la *Normande* (GROSCLAUDE *et al.*, 1966 ; GROSCLAUDE, 1974) ; d'autre part le taux de recombinaison intrinsèque est sans doute le même chez les bovins et les zébus. Le fait que la combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} soit fixée chez le zébu malgache, et pas chez les bovins français, peut donc être attribué à une différence d'effectif génétique entre les populations considérées : il est certain en tous cas que la valeur de N dans les races françaises est actuellement suffisamment faible pour que Ne soit très inférieur à 1 ; par contre, ce que l'on sait sur les méthodes d'élevage du zébu malgache suggère que l'effectif génétique y est suffisamment élevé pour que Ne soit supérieur à 1. Toutefois, la solution de ce problème n'est peut-être pas aussi simple, car la réduction de l'effectif génétique des populations bovines françaises semble être un phénomène relativement récent.

La coexistence des complexes alléliques α_{s1} -Cn^B— β -Cn^{A1} et α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} peut être rapprochée de celle des complexes α_{s1} -Cn^B— β -Cn^B et α_{s1} -Cn^c— β -Cn^B, qui apparaît chez les zébus indiens et africains étudiés par ASCHAFFENBURG *et al.* (1968) encore qu'il serait utile, ici aussi, de vérifier que β -Cn^B commande le même mutant dans ces deux combinaisons. Par contre, l'allèle β -Cn^D a toujours été trouvé associé, jusqu'à présent, à α_{s1} -Cn^c (ASCHAFFENBURG *et al.*, 1968 ; GROSCLAUDE *et al.*, 1974). On notera que, selon la disposition relative des loci α_{s1} -Cn et β -Cn que nous avons proposée, (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 c), les sites mutés différenciant α_{s1} C d' α_{s1} B et β D de β A² peuvent être très proches sur le chromosome. Cependant, les fréquences alléliques sont telles (autour de 0,01-0,03 pour la combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^D) que la probabilité des hétérozygotes susceptibles de produire des recombinants est nettement plus faible que dans le cas de la combinaison α_{s1} -Cn^c— β -Cn^{A1} par exemple (0,007 contre 0,04 environ) ; d'autres études de populations seraient donc souhaitables à ce stade.

Notons enfin que l'analyse de la répartition des génotypes aux loci α -La et β -Lg ne permet pas de déceler de linkage entre ces deux loci, contrairement à ce que pouvaient suggérer les données de BLUMBERG et TOMBS (1958). La recherche de liaisons éventuelles entre α -La et d'autres loci reste à faire.

Reçu pour publication en juillet 1974.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'a pu être entrepris, en 1968, que grâce à de nombreux concours : nous sommes en particulier redevables à M. J. J. NATAÏ, alors *Ministre de l'Agriculture*, de l'*Expansion Rurale* et du *Ravitaillement* du *Gouvernement Malgache*, d'avoir bien voulu nous donner l'autorisation d'effectuer notre tournée de prélèvements d'échantillons de lait ; M. J. PAGOT, alors directeur général de l'I. E. M. V. T., M. J. BUSTARRET, alors directeur général de l'I. N. R. A., et M. J. POLY, alors directeur du *Département de Génétique animale de l'I. N. R. A.* nous ont apporté un soutien important. Nous sommes reconnaissants à M. H. SERRES, alors inspecteur-en-chef au *Laboratoire central de l'Élevage* à Tananarive, à toute son équipe, ainsi qu'aux autorités locales, aux *Services vétérinaires* et aux éleveurs Malgaches d'avoir, par leur accueil, beaucoup facilité notre tâche sur le terrain.

L'analyse au spectromètre de masse a été effectuée par M. B. C. DAS, dans le service du Pr E. LEDERER, à l'*Institut de Chimie des substances naturelles*, C. N. R. S., Gif-sur-Yvette. Nous remercions M. DAS de son aide. Nous remercions également les Dr A. ROBERTSON et R. TOMASONE de leurs conseils.

SUMMARY

A STUDY ON THE GENETIC POLYMORPHISM OF *BOS INDICUS* LACTOPROTEINS, AS COMPARED WITH THAT OF *BOS TAURUS*

778 whey and 586 casein solutions, prepared from individual milks of Malagasy zebu (*Bos indicus*), were examined by starch gel and polyacrylamide gel electrophoresis to determine the genetic polymorphism of the milk proteins, and to compare this polymorphism with that found in the milk proteins of the bovine (*Bos taurus*).

The structural loci of the main five lactoproteins (α -lactalbumin, β -lactoglobulin, α_{s1} , β -, and κ -caseins) were all found to be biallelic and to determine the following classical variants ; La A and B ; Lg A and B ; α_{s1} B and C ; β A¹ and A² ; κ A and B. Variants β B and β D were not found in the Malagasy zebu milks. Allelic frequencies observed in the sample, as well as frequencies of the allelic combinations controlled by the genetic unit formed by the three casein loci, α_{s1} -Cn, β -Cn and κ -Cn, are given in table 1. Comparison of the allelic frequencies observed in the five main geographical sub-samples indicates a certain genetic homogeneity in the zebu population studied.

The amino-acid substitutions responsible for the differences in electrophoretic mobility shown by variants α_{s1} B and C, β A¹ and A², and κ A and B, were characterized by essentially the same methods as those previously used by the authors for studying the variants of bovine caseins. All substitutions were identical to those found in bovine casein, including the case when variants α_{s1} -C and β A¹ are controlled by the allelic combination α_{s1} -Cn^C- β -Cn^{A1}. [substitutions 192 Glu (α_{s1} -B) \rightarrow Gly (α_{s1} -C) ; 67 Pro (β A²) \rightarrow His (β A¹) and 148 Asp (κ A) \rightarrow Ala (κ B)]. In addition, the study of a sample of β B casein, prepared from the milk of a *Choa* zebu (from the Republic of Chad) indicated that zebu β B differed from β A¹ by the same substitution 122 Ser (β A¹) \rightarrow Arg (β B) as in the bovine, a result which calls into question the use of the specific notation β Bz to designate zebu β B. It is most likely that for each of the three loci, the polymorphism common to *Bos taurus* and *Bos indicus* can be attributed to single mutations, that occurred before the phylogenetic divergence of these two branches of the genus *Bos*, which, according to EPSTEIN (1971), took place in south-west Asia, in the fourth and third millennium B. C. The fact that the predominant allele of locus α_{s1} -Cn is not the same in *Bos taurus* (α_{s1} -B) as in *Bos indicus* (α_{s1} -C)

can be due to the effect of genetic drift during the phase of selection in small populations which probably accompanied domestication.

In addition to the two substitutions already found in the bovine [$_{148}$ Asp (αA) \rightarrow Ala (αB) responsible for the difference in net charge, and $_{136}$ Thr (αA) \rightarrow Ile (αB), having no effect on net charge] the « caseino-macropeptides » of αA and αB variants in *Malagasy zebu* differed by a third substitution, $_{135}$ Ile (αA) \rightarrow Thr (αB) which has no effect on the charge. However, since only a small number of casein samples was studied in both cases, no general conclusion can be drawn from this observation.

A sample of casein βD was prepared from individual milks from two *Nepalese yak* \times *zebu* cows : βD differed from βA^2 by the substitution $_{18}$ SerP (βA^2) \rightarrow Lys (βD). This substitution is probably the only one implicated in the difference in net charge between the two variants.

In contrast to the data, albeit limited, of BLUMBERG and TOMBS (1958), the repartition of genotypes at loci α -La and β -Lg in our population sample of *Malagasy zebu* fits exactly with that expected from the hypothesis of genetic independence of the two loci. Regarding loci α_{81} -Cn and β -Cn, the linkage disequilibrium in the *zebu* population studied — where the allelic combination α_{81} -Cn^C- β -Cn^{A1}, coexists with combinations α_{81} -Cn^B- β -Cn^{A2}, α_{81} -Cn^B- β -Cn^{A1} and α_{81} -Cn^C- β -Cn^{A2} — was not as strong as that which is observed in many western, especially French, breeds. This particular situation may be explained by the fact that the « effective size » of the *Malagasy zebu* population is probably much higher than that of most of the western breeds.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASCHAFFENBURG R., 1968. Genetic variants of milk proteins; their breed distribution. *J. Dairy Res.*, **35**, 447-460.
- 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.
- ASCHAFFENBURG R., SEN A., THOMPSON M. P., 1968. Genetic variants of casein in Indian and African Zebu cattle. *Comp. Biochem. Physiol.* **25**, 177-184.
- BELL K., HOPPER K. E., MCKENZIE H. A., MURPHY W. H., SHAW D. C., 1970. A comparison of bovine α -lactalbumin A and B of Droughmaster. *Biochim. biophys. Acta*, **214**, 437-447.
- BELL K., MCKENZIE H. A., SHAW D. C., 1968. Amino acid composition and peptide maps of β -lactoglobulin variants. *Biochim. biophys. Acta*, **154**, 284-294.
- BHATTACHARYA S. D., ROYCHOUDHURY A. K., SINHA N. K., SEN A., 1963. Inherited α -lactalbumin and β -lactoglobulin polymorphism in Indian Zebu cattle. Comparison of Zebu and Buffalo α -Lactalbumins. *Nature*, **197**, 797-799.
- BLUMBERG B. S., TOMBS M. P., 1958. Possible polymorphism of bovine α -lactalbumin. *Nature*, **181**, 683-684.
- BRAUNTZER G., CHEN R., SCHRANK B., STANGL A., 1972. Automatische Sequenzanalyse eines Proteins. (β -Lactoglobulin A B). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 832-834.
- BREW K., CASTELLINO F. J., VANAHAM T. C., HILL R. L., 1970. The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4570-4582.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Localisation dans la chaîne peptidique de la β -lactoglobuline bovine de la substitution Glu/Gln différenciant les variants génétiques B et D. *FEBS Lett.*, **33**, 73-76.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., 1971. Structure primaire de la caséine β bovine. *Eur. J. Biochem.*, **22**, 179-185.
- CEPPELLINI R., SINISCALCO M., SMITH C. A. B., 1956. The estimation of gene frequencies in a random-mating population. *Ann. hum. Genet.*, **20**, 97-115.
- EPSTEIN H., 1971. The origin of the domestic animals of Africa. Africana publishing Corporation, New York, London, Munich. Vol. 1, 573 p.
- GROSCLAUDE F., 1968. (Résultats non publiés).
- GROSCLAUDE F., 1974. (Résultats non publiés).
- GROSCLAUDE F., MAHE M.-F., 1971. (Résultats non publiés).
- GROSCLAUDE F., MAHE M.-F., MERCIER J.-C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J.-H., 1974 a. Comparaison des variants électrophorétiques des protéines du lait de yaks (*Bos poëphagus*) avec ceux des bovins (*Bos taurus*) et des zébus (*Bos indicus*) (en préparation).
- GROSCLAUDE F., MAHE M.-F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 a. Caractérisation des variants génétiques des caséines α_{81} et β bovines. *Eur. J. Biochem.*, **26**, 328-337.
- GROSCLAUDE F., MAHE M.-F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 b. Localisation des substitutions d'acides aminés différenciant les variants A et B de la caséine α bovine. *Ann. Génét. Sel. anim.*, **4**, 515-521.

- GROSCLAUDE F., MAHE M.-F., VOGLINO G.-F., 1974 b. Le variant βE et le code de phosphorylation des caséines bovines. *FEBS Lett.*, **45**, 3-5.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 a. 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., 1970 b. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence des acides aminés de la partie NH_2 -terminale. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 447-452.
- GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 c. Genetic aspects of cattle casein research. *Neth. Milk Dairy J.*, **27**, 328-340.
- GROSCLAUDE F., PUJOLLE J., RIBADEAU-DUMAS B., GARNIER J., 1966. Analyse génétique du groupe de loci de structure synthétisant les caséines bovines ; in : *Polymorphismes biochimiques des animaux*, 415-420. I. N. R. A., Paris.
- GROSCLAUDE F., QUEVAL R., 1973. (Résultats non publiés).
- HILL W. G., 1974. Estimation of linkage disequilibrium in random mating populations. *Heredity*. (Sous presse).
- HUANG W. Y., TANG J., 1970. Carboxyl-terminal sequence of human Gastricisin and Pepsin. *J. Biol. Chem.* **245**, 2189-2193.
- MERCIER J.-C., BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Structure primaire de la caséine αB bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222-235.
- MERCIER J.-C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 a. Structure primaire de la caséine α_{s1} bovine. Séquence des 48 résidus 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} bovine. 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., 1971. Structure primaire de la caséine α_{s1} 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-mercapto-éthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 521-530.
- OHTA T., KIMURA M., 1971. Linkage disequilibrium between two segregating nucleotide sites under the steady flux of mutations in a finite population. *Genetics*, **68**, 571-580.
- 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.
- RIBADEAU-DUMAS B., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., 1971 a. Structure primaire de la caséine β bovine. Enchaînement des 32 résidus d'acides aminés de la partie NH_2 -Terminale. *Eur. J. Biochem.*, **20**, 264-268.
- 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.
- RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., 1970. Structure primaire de la caséine β bovine. Isolement et composition en amino-acides des peptides tryptiques et des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 451-459.
- RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J.-C., 1971 b. Structure primaire de la caséine β bovine. Enchaînement des peptides tryptiques et des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène. *Eur. J. Biochem.* **18**, 252-257.
- THOMAS D. W. Mass spectrometry of N-permethylated peptide derivatives ; artifacts produced by C-methylation. *FEBS Lett.*, **5**, 53-56.
- THOMPSON M. P., GORDON W. G., PEPPER L., GREENBERG R., 1969. Amino acid composition of β -caseins from the milks of *Bos taurus* and *Bos indicus* cows : a comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.*, **30**, 91-98.
- VERIN P., 1967. Le Bœuf dans l'histoire ancienne de Madagascar. *Revue de Madagascar*, **38**, 35-37.
- VERIN P., 1972. (Communication personnelle).
- VILKAS E., LEDERER E., MASSOT J.-C., 1968. N-méthylation de peptides par la méthode d'Hakomori. Structure du mycoside C_{61} . *Tetrahedron Lett.*, **26**, 3089-3092.
- WAKE R. G., BALDWIN R. L., 1961. Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. biophys. Acta*, **47**, 225-239.