

## POLYMORPHISME DES LACTOPROTÉINES DE BOVINÉS NÉPALAIS

I. — MISE EN EVIDENCE, CHEZ LE YAK, ET CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE  
DE DEUX NOUVEAUX VARIANTS :  $\beta$ -LACTOGLOBULINE  $D_{Yak}$  ET CASÉINE  $\alpha_{s1} E$

F. GROSCLAUDE, Marie-Françoise MAHÉ, J. C. MERCIER\*,

J. BONNEMAIRE\*\* et J. H. TEISSIER\*\*

*Laboratoire de Génétique biochimique,*

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

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

---

### RÉSUMÉ

Une analyse du polymorphisme génétique des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la  $\beta$ -lactoglobuline a été effectuée à partir des laits individuels de 156 femelles du genre *Bos* élevées dans une haute vallée népalaise et appartenant aux types génétiques suivants : 42 yaks, 7 bovins et 107 hybrides divers, dont 55 F 1 de type ♂ Yak  $\times$  ♀ Zébu, 17 F 1 de type ♂ Bovin  $\times$  ♀ Yak, et 15 F 1 de type ♂ (Bovin  $\times$  Zébu)  $\times$  ♀ Yak. Ce travail permet surtout de comparer les variants électrophorétiques des lactoprotéines du Yak (*Bos poëphagus* ou *Bos grunniens*) à ceux, déjà bien identifiés, des bovins (*Bos taurus*) et des zébus (*Bos indicus*).

Les 42 yaks ne possèdent qu'un type d' $\alpha$ -lactalbumine, identique, par électrophorèse, au variant  $\alpha$ -LaB bovin ou zébu, et un seul type de  $\beta$ -lactoglobuline, identique au variant  $\beta$ -LgD bovin. Toutefois, cette  $\beta$ -lactoglobuline de Yak diffère du variant  $\beta$ -LgB bovin par une substitution autre que celle qui caractérise le variant  $\beta$ -LgD bovin [158 Glu ( $\beta$ -LgB)  $\rightarrow$  Gly ( $\beta$ -LgD du Yak) au lieu de 45 Glu ( $\beta$ -LgB)  $\rightarrow$  Gln ( $\beta$ -LgD bovin)]. Il s'agit donc d'un type non encore décrit, paraissant propre au Yak, et appelé  $\beta$ -LgDYak.

Au locus  $\alpha_{s1}$ -Cn, un variant inconnu jusqu'ici, plus lent qu' $\alpha_{s1}$ -CnC à pH alcalin, et plus rapide à pH acide, a été mis en évidence. Ce variant,  $\alpha_{s1}$ -CnE, diffère d' $\alpha_{s1}$ -CnC par la substitution 59 Gln ( $\alpha_{s1}$ -CnC)  $\rightarrow$  Lys ( $\alpha_{s1}$ -CnE); il paraît propre au Yak; sa fréquence atteint 0,35 chez les 42 sujets dont le lait a été examiné, contre 0,63 pour  $\alpha_{s1}$ -CnC et 0,02 pour  $\alpha_{s1}$ -CnB. Au locus  $\beta$ -Cn, les 42 yaks sont homozygotes pour l'allèle  $\beta$ -CnA<sup>1</sup>, alors qu'au locus  $\kappa$ -Cn, on retrouve les deux seuls variants trouvés jusqu'à présent chez les bovins et les zébus,  $\kappa$ -CnA, qui prédomine (0,93), et  $\kappa$ -CnB (0,07). La combinaison allélique  $\alpha_{s1}$ -CnC— $\beta$ -CnA<sup>1</sup>— $\kappa$ -CnA est la plus fréquente chez ces yaks (0,61), ce qui tend à les rapprocher des zébus plutôt que des bovins.

Deux correctifs sont par ailleurs apportés, en annexe de ce travail, à la séquence de la  $\beta$ -lactoglobuline publiée par BRAUNITZER *et al.* (1972).

## INTRODUCTION

L'inventaire des variants électrophorétiques de l' $\alpha$ -lactalbumine, de la  $\beta$ -lactoglobuline, et des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  a été effectué dans de nombreuses races de bovins (*Bos taurus*) et de zébus (*Bos indicus*). Certains variants se trouvent à la fois dans les deux espèces ( $\alpha$ -L<sub>a</sub> A et B;  $\beta$ -L<sub>g</sub> A et B;  $\alpha_{s1}$ -C<sub>n</sub> B et C;  $\beta$ -C<sub>n</sub> A<sup>1</sup>, A<sup>2</sup> et B;  $\kappa$ -C<sub>n</sub> A et B) tandis que les autres n'ont été trouvés jusqu'ici que dans l'une d'entre elles ( $\beta$ -L<sub>g</sub> C et D,  $\alpha_{s1}$ -C<sub>n</sub> A et D,  $\beta$ -C<sub>n</sub>A<sup>3</sup>, C et E chez les bovins;  $\beta$ -C<sub>n</sub>D chez les zébus) (voir revues bibliographiques dans ASCHAFFENBURG, 1968, et GROSCLAUDE, 1974).

À l'heure actuelle, la structure primaire de ces cinq lactoprotéines est complètement élucidée (BREW *et al.*, 1970, pour l' $\alpha$ -lactalbumine; BRAUNITZER *et al.*, 1972, pour la  $\beta$ -lactoglobuline; MERCIER *et al.*, 1971, pour la caséine  $\alpha_{s1}$ ; RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1972, pour la caséine  $\beta$ ; MERCIER *et al.*, 1973, pour la caséine  $\kappa$ ) et, à l'exception de la substitution His/Gln qui différencie les variants  $\beta$ -L<sub>g</sub> C et  $\beta$ -L<sub>g</sub> B (BELL *et al.*, 1968) et qui n'est pas exactement localisée, on connaît la nature et la localisation des altérations qui différencient tous leurs variants connus à ce jour. (BELL *et al.*, 1970, pour l' $\alpha$ -lactalbumine; BRAUNITZER *et al.*, 1972, et BRIGNON et RIBADEAU-DUMAS, 1973, pour la  $\beta$ -lactoglobuline; GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a, b et 1974 a, b, pour les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ).

Nous avons par ailleurs montré (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a) que les variants des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  qui sont communs à *Bos taurus* et à *Bos indicus* diffèrent, dans ces deux espèces, par des substitutions d'acides aminés identiques. Ces variants communs, qui sont également les plus fréquents, dérivent donc, selon toute vraisemblance, de mutations uniques, survenues avant la divergence phylogénique des deux espèces. Par contre, les variants qui n'ont été trouvés jusqu'ici que chez *Bos taurus* ou chez *Bos indicus*, et dont la fréquence est dans l'ensemble plus faible, pourraient être apparus ultérieurement. De manière générale, les données d'ordre biochimique et génétique dont on dispose actuellement sur les variants des caséines du genre *Bos* permettent d'avancer des hypothèses cohérentes sur leurs relations phylogéniques (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a, 1972 c; GROSCLAUDE, 1974).

Les recherches sur le polymorphisme des caséines bovines ont été stimulées, dans ce laboratoire, par la mise en évidence d'une situation génétique particulière: les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  sont en effet sous le contrôle de 3 loci de structure étroitement liés, et l'on peut penser que, dans une situation de ce type, l'activité synthétique des loci est coordonnée selon un processus spécifique. Au niveau des populations, la liaison des loci  $\alpha_{s1}$ -C<sub>n</sub>,  $\beta$ -C<sub>n</sub> et  $\kappa$ -C<sub>n</sub> se traduit par un « déséquilibre de linkage » très marqué, surtout entre les allèles des loci  $\alpha_{s1}$ -C<sub>n</sub> et  $\beta$ -C<sub>n</sub>. En fait, pour être complète, l'analyse génétique du polymorphisme des caséines doit aussi porter sur les combinaisons alléliques transmises par le groupe  $\alpha_{s1}$ -C<sub>n</sub>— $\beta$ -C<sub>n</sub>— $\kappa$ -C<sub>n</sub>, qui peut être traité comme une seule unité génétique (voir sur l'ensemble de ces problèmes les analyses récentes de GROSCLAUDE *et al.*, 1972 c, et GROSCLAUDE, 1974).

Au stade actuel des recherches, il paraît utile de poursuivre la collecte d'informations sur le polymorphisme des lactoprotéines du genre *Bos* pour mieux analyser, sous ses différents aspects, la situation génétique particulièrement originale qui a été mise en évidence.

Le présent travail, entrepris dans ce but, porte sur le troupeau à base de yaks d'une haute vallée népalaise. Considéré auparavant comme un genre à part (*Poëphagus grunniens*), le Yak est désormais classé dans le genre *Bos*, à côté des bovins (*Bos taurus*) et des zébus (*Bos indicus*) sous l'appellation de *Bos poëphagus* ou *Bos grunniens*. Le polymorphisme de ses lactoprotéines n'a fait jusqu'ici, à notre connaissance, l'objet d'aucune étude, à l'exception d'un travail de LOZOVAYA (1973) qui donne des informations assez succinctes sur le polymorphisme de la  $\beta$ -lactoglobuline de 49 yaks du Pamir.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Origine des échantillons*

Les prélèvements de lait ont été effectués en septembre 1972 par deux d'entre nous (J. BONNEMAIRE et J. H. TEISSIER) dans la zone d'estivage (3 300-3 600 m d'altitude) d'une haute vallée du Népal, la vallée du Langtang, à l'occasion d'une « recherche coopérative sur programme » organisée par le C. N. R. S. (RCP 253) et portant sur l'écologie et la géologie de l'Himalaya central (BONNEMAIRE et TEISSIER, 1973, 1976). Dans cette vallée, longue de 25 km, large de 1 à 2 km environ, et située au nord de Kathmandu, près de la frontière tibétaine, existent 5 troupeaux collectifs qui pratiquent la transhumance estivale; ils sont constitués de yaks, dont les caractéristiques sont conformes aux données bibliographiques (DENISOV, 1958; SCHULTHESS, 1967; EPSTEIN, 1969, 1974; BONNEMAIRE, 1976), de bovins assimilables à la race naine du Tibet (EPSTEIN, 1969), et d'hybrides divers entre yaks d'une part, et bovins et zébus d'autre part.

En fait, la conduite des troupeaux suit des règles précises, visant à tirer parti de l'effet « d'hétérosis » manifesté par les hybrides de première génération (F<sub>1</sub>) dont la production laitière est plus élevée, et l'intervalle de vêlage plus court (1 an) que celui des yaks et des bovins locaux (2 ans). Les veaux des femelles Yak et Bovin sont élevés systématiquement, alors que les produits des autres types génétiques sont normalement éliminés après leur naissance; les quelques mâles de type *Bos taurus* × *Bos indicus*, ainsi que les femelles de type *Bos poëphagus* × *Bos indicus* ne sont pas produits sur place, mais proviennent des basses vallées népalaises. Cette pratique de l'exploitation systématique des hybrides F<sub>1</sub> du Yak et des bovins ou des zébus se retrouve apparemment dans toutes les régions d'élevage du Yak (EPSTEIN, 1974).

Le tableau 1 donne la répartition, par type génétique, de l'ensemble des femelles traites dans la vallée de Langtang en septembre 1972, ainsi que celle des échantillons de lait collectés. On voit que pour les yaks, les bovins et les hybrides F<sub>1</sub>, les rapports du nombre d'échantillons au nombre des femelles traites sont assez voisins (de 35 à 52 p. 100).

### *Conservation des échantillons*

Les échantillons, dont la collecte a duré 5 jours, ont été additionnés d'une solution aqueuse de bichromate de potassium (1 g/l) à raison de 1,5 ml par litre de lait environ (4 gouttes par flacon de 30 ml); dès leur prélèvement ils ont été refroidis à l'aide de glace prélevée sur un glacier et, en fin de collecte, ils ont été transportés en avion à Kathmandu, congelés, puis envoyés à Paris dans des boîtes isothermes.

### *Origine des produits*

À l'exception de la thermolysine (Merck, 6 000 PU/mg); les enzymes utilisées proviennent de la firme Worthington Biochemical Corporation: trypsine (2 × cristallisée, TRL 7 AA);  $\alpha$ -chymotrypsine (3 × cristallisée, CDI 7 CD); carboxypeptidase A (COA DFP, 50 mg/ml); phosphatase alcaline (BAPC OCB, 10 mg/ml).

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; hydrazine hydratée, Prolabo, traitée 3 heures à reflux en présence de pastilles de soude puis redistillée, toujours sous courant d'azote indice de réfraction de l'hydrazine anhydre obtenue:

$\alpha_D^{11} = 1,467$ ); D.E.A.E. cellulose microgranulaire DE 32, Whatman; Dowex AG-50 W X2, 200-400 mesh, Biorad; Sephadex, Pharmacia; feuilles plastiques CCM, gel de silice F<sub>254</sub>, Merck, anhydride maléique, Prolabo; bromure de cyanogène, Schuchardt.

TABLEAU I

*Répartition, par type génétique, des femelles du genre Bos traitées dans la vallée du Langtang et des échantillons de lait collectés dans cette vallée en septembre 1972*

Types génétiques	Femelles traitées		Échantillons <sup>(1)</sup>		
	Effectif	% de l'effectif total des femelles traitées	Nombre	% du nombre total d'échantillons	% de l'effectif total des femelles traitées
<i>Espèces pures :</i>					
Yaks .....	80	22,2	42 <sup>(2)</sup>	26,9	52,5
Bovins .....	20	5,6	7 <sup>(3)</sup>	4,5	35,0
<i>Hybrides F 1 de Yaks :</i>					
♂ Bovin × ♀ Yak .....	80	22,2	17	10,9	40,0
♂ (Bovin × Zébu) × ♀ Yak .....			15	9,6	
♂ Yak × ♀ Zébu .....	125	34,7	55	35,3	44,0
♂ Yak × ♀ Bovin .....	5	1,4	2	1,3	40,0
Total des F 1 .....	210	58,3	89	57,1	42,4
<i>Autres types :</i>					
Back-cross F 2 et F 3 des femelles F 1 avec un mâle Bovin ou Bovin × Zébu .....	41	11,4	7	4,5	17,1
Recroisement avec un mâle Yak des femelles du type précédent .....	6	1,7	6	3,8	100
Back-cross F 2 des femelles F 1 avec un mâle Yak .....	3	0,8	1	0,6	33,3
Indéterminés .....			4	2,6	
Total .....	360	100	156	100	43,3

<sup>(1)</sup> 15 à 30 ml.

<sup>(2)</sup> Dont 3 prélèvements de 0,5 à 1 l.

<sup>(3)</sup> Dont 2 prélèvements de 0,5 à 1 l.

#### *Préparation des caséines entières et des lactosérums*

Les caséines entières et les lactosérums ont été séparés à partir des 5 prélèvements de 0,5 à 1 litre selon le protocole de MERCIER *et al.* (1968); les échantillons de petit volume ont été traités par la technique d'ASCHAFFENBURG et DREWRY (1959). Les lactosérums ont été congelés, et les caséines lyophilisées.

*Préparation de la caséine  $\alpha_{s1}$  et de la  $\beta$ -lactoglobuline*

La caséine  $\alpha_{s1}$  a été préparée par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, selon MERCIER *et al.* (1968), et la  $\beta$ -lactoglobuline par la méthode d'ASCHAFFENBURG et DREWRY (1957).

*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). Certains phénotypes de caséines ont également été comparés par électrophorèse en gel d'amidon, à pH 8,6 selon ASCHAFFENBURG et MICHALAK (1968).

*S-carboxyméthylation*

La  $\beta$ -lactoglobuline a été S-carboxyméthylée selon la technique de WOYCHIK (1965).

*Détermination de la séquence N-terminale à l'aide du Séquenceur*

La dégradation séquentielle de 11,7 mg de  $\beta$ -lactoglobuline S-carboxyméthylée 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).

*Hydrolyses enzymatiques*

Les conditions générales d'emploi des enzymes ont été décrites dans nos publications antérieures : trypsine (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 a),  $\alpha$ -chymotrypsine, carboxypeptidases A et B, leucine aminopeptidase (MERCIER *et al.*, 1970 a); carboxypeptidase à pH 5,4 (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 b); thermolysine (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1971 b); phosphatase alcaline (RIBADEAU-DUMAS *et al.*, 1971 a). 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 : quantité de peptide, rapport molaire enzyme/substrat (E/S), température et durée de la réaction. En ce qui concerne les exopeptidases, le volume de la préparation commerciale employé a été rapporté, 0,1  $\mu$  mole de peptide, et les résultats ont été exprimés en moles d'acides aminés libérés par mole de peptide.

*Autres techniques*

Les autres techniques utilisées dans ce travail ont été décrites antérieurement : maléylation, électrophorèse et chromatographie préparatives sur papier, chromatographie sur colonnes de DEAE-cellulose, Dowex et Sephadex, dosage des acides aminés (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 a); hydrolyse par le bromure de cyanogène (MERCIER *et al.*, 1970 b); dégradation récurrente d'Edman par procédé manuel (MERCIER *et al.*, 1976).

*Nomenclature des peptides*

La nomenclature des peptides résultant de l'hydrolyse d'un peptide plus long prend en compte, dans l'ordre : a) la dénomination du peptide de départ, b) les initiales de l'enzyme ou du réactif ayant servi à l'hydrolyse, (C : chymotrypsine, CN : bromure de cyanogène, Tm : trypsine après maléylation, 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 sur papier. Cependant, dans certains cas, pour faciliter les comparaisons, nous avons repris la nomenclature utilisée pour les mêmes peptides dans des publications antérieures, même si le mode de préparation de ces peptides était différent.

## RÉSULTATS

## I. — Inventaire et fréquence des variants électrophorétiques

Le tableau 2 donne la liste des variants observés, sur l'ensemble des 156 échantillons, au niveau des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la  $\beta$ -lactoglobuline, ainsi que la fréquence de ces variants dans les 4 groupes correspondant aux types génétiques les plus représentés. L'étude d'un polymorphisme observé au niveau des caséines  $\alpha_{s2}$  (caséines «  $\alpha_s$  mineures ») fera l'objet d'une publication complémentaire (GROSCLAUDE *et al.*, 1976).

## a) Caséines.

Caséine  $\alpha_{s1}$ .

Outre les variants classiques,  $\alpha_{s1}$ -CnB et  $\alpha_{s1}$ -CnC, on observe, sur une partie des électrophorogrammes, une bande plus lente que celle du variant  $\alpha_{s1}$ -CnC. Cette bande peut être soit associée à l'un des variants  $\alpha_{s1}$ -CnB ou  $\alpha_{s1}$ -CnC, soit unique (fig. 1). Elle se comporte donc comme un variant du locus  $\alpha_{s1}$ -Cn. Dans cette hypothèse, et en appelant ce variant  $\alpha_{s1}$ -CnE, la répartition des génotypes du locus  $\alpha_{s1}$ -Cn chez les 42 yaks est la suivante (en notation simplifiée):

$$B/C : 1; C/C : 18; B/E : 1; C/E : 16; E/E : 6.$$

La fréquence du variant  $\alpha_{s1}$ -CnE dans ce groupe de yaks est donc de 0,35, et la répartition des génotypes attendue dans l'hypothèse où la structure de ce groupe est conforme à la loi de HARDY-WEINBERG est la suivante :

$$B/C : 1; C/C : 17; B/E : 1; C/E : 18,5; E/E : 5,5.$$

Cette répartition théorique est très voisine de la répartition observée, ce qui tend à confirmer que la bande électrophorétique inconnue jusqu'ici représente bien un variant de la caséine  $\alpha_{s1}$ ; ceci a été définitivement établi grâce à une analyse biochimique rapportée dans la suite de cette publication.

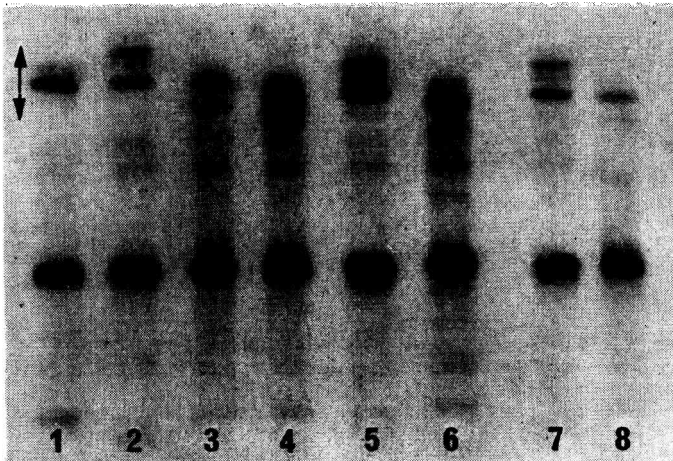


FIG. 1. — Mobilité relative du variant  $\alpha_{s1}$ -CnE dans les conditions d'électrophorèse en gel alcalin d'ASCHAFFENBURG et MICHALAK (1968). Sens de migration : vers l'anode, (ici, vers le haut). La zone de migration des variants de caséine  $\alpha_{s1}$  est délimitée par une flèche double. Génotypes représentés (en notation simplifiée) : 1 : B/B; 2 : A/B; 3 : B/E; 4 : C/E; 5 : D/C; 6 : E/E; 7 : D/C; 8 : C/C.

On remarquera que la fréquence du variant  $\alpha_{s1}$ -CnE chez les hybrides F I est sensiblement la moitié de la fréquence chez les yaks (0,18 sur l'ensemble des 87 hybrides F I du tableau 2); d'autre part, aucun type homozygote n'a été observé chez ces hybrides. Le variant  $\alpha_{s1}$ -CnE paraît donc propre aux yaks.

En ce qui concerne les variants classiques, on notera que le variant  $\alpha_{s1}$ -CnC prédomine chez les yaks, ce qui tend à rapprocher ceux-ci des zébus plutôt que des bovins. D'autre part, la fréquence du variant  $\alpha_{s1}$ -CnB semble être nettement plus élevée chez les bovins que chez les zébus locaux, ce qui est conforme à une situation presque générale (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a). Faute d'effectifs suffisants et représentatifs, on ne peut toutefois donner aucune estimation de fréquence (parmi les 7 bovins purs, on compte 1 B/B, 3 B/C et 3 C/C).

Signalons que, sur certains électrophorogrammes de caséines de yaks, d'hybrides Yak  $\times$  Zébu et d'hybrides (Bovin  $\times$  Zébu)  $\times$  Yak, une bande classée comme  $\alpha_{s1}$ -CnC paraît avoir en fait, une mobilité légèrement plus anodique que celle d' $\alpha_{s1}$ -CnC. Il pourrait s'agir d'un variant non encore identifié dont la fréquence dans les trois groupes cités ci-dessus serait respectivement de 0,06, 0,08 et 0,07, mais les données sur ce variant présumé sont trop insuffisantes pour autoriser une conclusion définitive; compte-tenu de l'ordre de grandeur des fréquences qui viennent d'être indiquées, le fait de négliger cette éventuelle subdivision allélique au locus  $\alpha_{s1}$ -Cn est sans conséquences sur les conclusions du présent travail.

#### Caséine $\beta$ .

Tous les 42 yaks ne possèdent que le variant  $\beta$ -CnA<sup>2</sup>. On notera chez les hybrides Zébu  $\times$  Yak, la présence du variant  $\beta$ -CnD qui n'a été trouvé jusqu'ici que chez des zébus (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a), et qui, selon toute vraisemblance, provient, chez ces hybrides, du parent Zébu; on remarquera aussi l'absence totale du variant  $\beta$ -CnA<sup>1</sup>.

#### Caséine $\kappa$ .

Le variant  $\kappa$ -CnA prédomine dans tous les types génétiques et notamment chez les yaks.

#### Combinaisons alléliques de l'unité génétique $\alpha_{s1}$ -Cn— $\beta$ -Cn— $\kappa$ -Cn.

Les fréquences des combinaisons alléliques de l'unité génétique formée par les loci  $\alpha_{s1}$ -Cn,  $\beta$ -Cn et  $\kappa$ -Cn ont été calculées, chez les yaks, par la méthode de CEPPELLINI *et al.*, (1956); elles sont les suivantes :

$$\alpha_{s1}\text{-CnC—}\beta\text{-CnA}^2\text{—}\kappa\text{-CnA} = 0,61$$

$$\alpha_{s1}\text{-CnC—}\beta\text{-CnA}^2\text{—}\kappa\text{-CnB} = 0,02$$

$$\alpha_{s1}\text{-CnE—}\beta\text{-CnA}^2\text{—}\kappa\text{-CnA} = 0,30$$

$$\alpha_{s1}\text{-CnE—}\beta\text{-CnA}^2\text{—}\kappa\text{-CnB} = 0,05$$

$$\alpha_{s1}\text{-CnB—}\beta\text{-CnA}^2\text{—}\kappa\text{-CnA} = 0,02$$

L'examen des résultats obtenus chez les hybrides montre que la combinaison  $\alpha_{s1}$ -CnC— $\beta$ -CnA<sup>2</sup>— $\kappa$ -CnA est également la plus fréquente chez les zébus locaux; d'autre part, le variant  $\beta$ -CnD figure dans la combinaison  $\alpha_{s1}$ -CnC— $\beta$ -CnD— $\kappa$ -CnA, et la variante  $\beta$ -CnB dans la combinaison  $\alpha_{s1}$ -CnB— $\beta$ -CnB— $\kappa$ -CnB.

b) *Protéines du lactosérum.**α-lactalbumine.*

On retrouve chez les zébus locaux le variant toujours présent dans cette espèce, α-LaA; mais ce variant existe également ici, quoiqu'à plus faible fréquence, chez les bovins. Il paraît absent chez les yaks.

*β-lactoglobuline.*

On observe ici une situation très particulière. Tous les yaks ne possèdent qu'une bande de β-lactoglobuline qui ne peut être distinguée, ni à pH alcalin, ni à pH acide du variant β-LgD (GROSCLAUDE *et al.*, 1966); (à pH acide β-Lg A, B et D migrent au même niveau); d'autre part, les 87 hybrides pris en compte dans le tableau 2 sont tous hétérozygotes pour ce variant de type D et pour l'un des variants classiques β-Lg A ou β-Lg B. Chez ces hybrides, le variant de type D provient de toute évidence du parent Yak, et le variant β-LgA ou β-LgB du parent bovin ou zébu. Le locus de la β-lactoglobuline permet ainsi de caractériser l'espèce *Bos poëphagus* par rapport aux espèces *Bos taurus* et *Bos indicus*. Notons que, parmi les types génétiques divers de très petit effectif qui ne sont pas inclus dans le tableau 2, il y a toutefois une exception : celle de l'un des deux sujets classés ♂ Yak × ♀ Bovin qui est homozygote pour la β-lactoglobuline de type D du Yak. Cette observation sera discutée dans la suite.

2. — *Étude biochimique de la β-lactoglobuline D du Yak*

La composition en acides aminés de la β-lactoglobuline de Yak figure dans le tableau 3, à côté des compositions des variants β-LgA, B et D bovins. La protéine de Yak comporte visiblement un résidu glycyle de plus que les variants β-LgB et D bovins; elle semble par ailleurs compter un résidu glutamyle ou glutaminyle en moins, et peut être un résidu leucyle en plus. Pour tenter d'identifier et de localiser la ou les substitutions différenciant la β-lactoglobuline du Yak du variant β-LgB bovin, trois approches complémentaires ont été utilisées.

a) *Séquence N-terminale.*

La séquence des 20 premiers résidus d'acides aminés de la β-lactoglobuline de Yak, établie à l'aide du Séquenceur, est identique à celle de la β-lactoglobuline bovine (BRAUNITZER *et al.*, 1972, avec le correctif donné en Annexe du présent travail) (fig. 2).

b) *Hydrolyse par le bromure de cyanogène.*

10 μ moles de β-lactoglobuline de Yak S-carboxyméthylée ont été hydrolysées par le bromure de cyanogène. Les peptides obtenus — CN 1 à CN 5 dans la nomenclature de BRAUNITZER *et al.*, (1972) — ont été purifiés par passage successif sur colonne de Sephadex G 75 en acide acétique 50 p. 100 et sur colonne de Sephadex G 25 en acide acétique 30 p. 100, puis par électrophorèse préparative sur papier. L'examen de leurs compositions en acides aminés indique que le peptide C-terminal, CN 5, diffère de son homologue bovin par une substitution Glx (β-LgB bovin) → Gly (β-LgD de Yak); par contre le nombre de résidus leucyle paraît inchangé chez le yak (tabl. 3).



TABLEAU 2

Fréquence des variants des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , de l' $\alpha$ -lactalbumine et de la  $\beta$ -lactoglobuline dans le groupe de yaks et dans les trois groupes d'hybrides les plus nombreux

Variants	Types génétiques				
	Yak N = 42	Yak × Zébu N = 55	Bovin × Yak N = 17	(Bovin × Zébu) × Yak N = 15	
$\alpha_{s1}$ -Cn	{ B .....	0,02	0,05	0,53	0,23
	{ C .....	0,63	0,78	0,26	0,57
	{ E .....	0,35	0,17	0,21	0,20
$\beta$ -Cn	{ A <sup>2</sup> .....	1,00	0,97	0,91	0,97
	{ B .....	—	0,01	0,09	0,03
	{ D .....	—	0,02	—	—
$\kappa$ -Cn	{ A .....	0,93	0,86	0,82	0,90
	{ B .....	0,07	0,14	0,18	0,10
$\alpha$ -La	{ A .....	—	0,10	0,03	0,10
	{ B .....	1,00	0,90	0,97	0,90
$\beta$ -Lg	{ A .....	—	0,09	—	—
	{ B .....	—	0,41	0,50	0,50
	{ D <sub>Yak</sub> .....	1,00	0,50 *	0,50 **	0,50 **

\* Hybrides tous hétérozygotes pour  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> et  $\beta$ -LgA ou  $\beta$ -LgB

\*\* Hybrides tous hétérozygotes pour  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> et  $\beta$ -LgB

c) Hydrolyse par la chymotrypsine.

Un hydrolysats chymotrypsique de 50  $\mu$ moles de  $\beta$ -lactoglobuline de Yak S-carboxyméthylée (E/S : 1/75; pH 8,0; 40°C; 3 h 30) a été chromatographié sur colonne de résine Dowex AG-50 W-X 2; 12 fractions ont ainsi été obtenues. Une vingtaine de peptides présents dans ces fractions ont été purifiés par une chromatographie sur colonne de Sephadex G 25 en acide acétique 30 p. 100, suivie en général d'une chromatographie ou d'une électrophorèse préparative sur papier. En se basant sur leur composition en acides aminés, ces peptides peuvent être localisés sans ambiguïté dans la séquence donnée par BRAUNITZER *et al.*, (1972) pour le variant  $\beta$ -LgB (fig. 2), mais le peptide C 6 b I, qui ne peut correspondre qu'à la partie C-terminale de la chaîne polypeptidique (résidus 150 à 162), diffère de son homologue bovin par une substitution Glx ( $\beta$ -LgB bovin)  $\rightarrow$  Gly ( $\beta$ -LgD du yak) ce qui confirme l'observation faite sur le peptide CN 5 (tabl. 3 et fig. 2).

TABLEAU 3

Comparaison de la composition en acides aminés du variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> avec celle des variants  $\beta$ -LgA, B et D :  
composition en acides aminés des peptides CNBr du variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>

Résidus d'acides aminés	$\beta$ -lactoglobulines						Peptides CNBr du variant $\beta$ -LgD <sub>Yak</sub>				
	Bovines			De Yak			CN 1	CN 2	CN 3	CN 4	CN 5
	A	B	D	D	D	D					
Asx	16	15	15	14,71 (15)	—	—	4,00 (1)	9,00 (9)	4,10 (4)	1,07 (1)	
Thr	8	8	8	7,96 (8)	1,78 (2)	—	0,92 (1)	3,12 (3)	4,07 (1)	0,96 (1)	
Ser	7	7	7	7,39 (7)	—	—	0,84 (1)	3,06 (3)	1,89 (2)	1,00 (1)	
Glx	25	25	25	24,01 (24)	1,44 (1) *	—	1,28 (1) *	11,86 (11) *	8,42 (8) *	2,96 (3)	
Pro	8	8	8	7,97 (8)	—	—	—	4,12 (4)	3,00 (3)	1,07 (1)	
Gly	3	4	4	5,41 (5)	—	—	1,92 (2)	2,31 (2)	—	1,15 (1)	
Ala	14	15	15	14,76 (15)	—	—	1,92 (2)	7,75 (8)	4,82 (5)	—	
Val	10	9	9	8,65 (9)	1,00 (1)	—	0,92 (1)	4,50 (5)	2,14 (2)	—	
Cys/2	5	5	5	3,80 (5) ***	—	—	—	1,25 (2) **	1,63 (2)	0,85 (1)	
Met	4	4	4	3,78 (4)	—	(1)	—	—	—	—	
Ile	10	10	10	9,48 (10)	0,76 (1)	—	0,88 (1)	4,81 (6)	5,21 (5)	1,77 (2)	
Leu	22	22	22	22,91 (22)	0,97 (1)	—	1,88 (2)	11,44 (12)	—	1,85 (2)	
Tyr	4	4	4	3,68 (4)	—	—	0,76 (1)	2,31 (3)	0,89 (1)	—	
Phe	4	4	4	4,24 (4)	—	—	—	1,94 (2)	2,93 (3)	0,92 (1)	
Lys	15	15	15	14,69 (15)	—	—	1,64 (2)	9,36 (10)	—	—	
His	2	2	2	1,87 (2)	—	—	—	1,06 (1)	0,89 (1)	1,62 (2)	
Arg	3	3	3	2,92 (3)	—	—	**** (1)	**** (1)	—	0,96 (1)	
Trp	2	2	2	2,42 (2)	—	—	—	—	—	—	
	162	162	162	162	7	17	83	38	17	17	

Les quantités d'acides aminés sont exprimées en moles d'acide aminé par mole de peptide; entre parenthèses : valeurs entières proposées.

\* Valeur comprenant celle de l'homosérine.

\*\* Interprétation confirmée par l'isolement de deux peptides chymotrypsiques contenant un résidu cystéyle (fig. 2).

\*\*\* Interprétation tenant compte des valeurs obtenues pour CN 3, CN 4, et CN 5.

\*\*\*\* Mis en évidence par le réactif d'ENRICH (Block *et al.*, 1962).

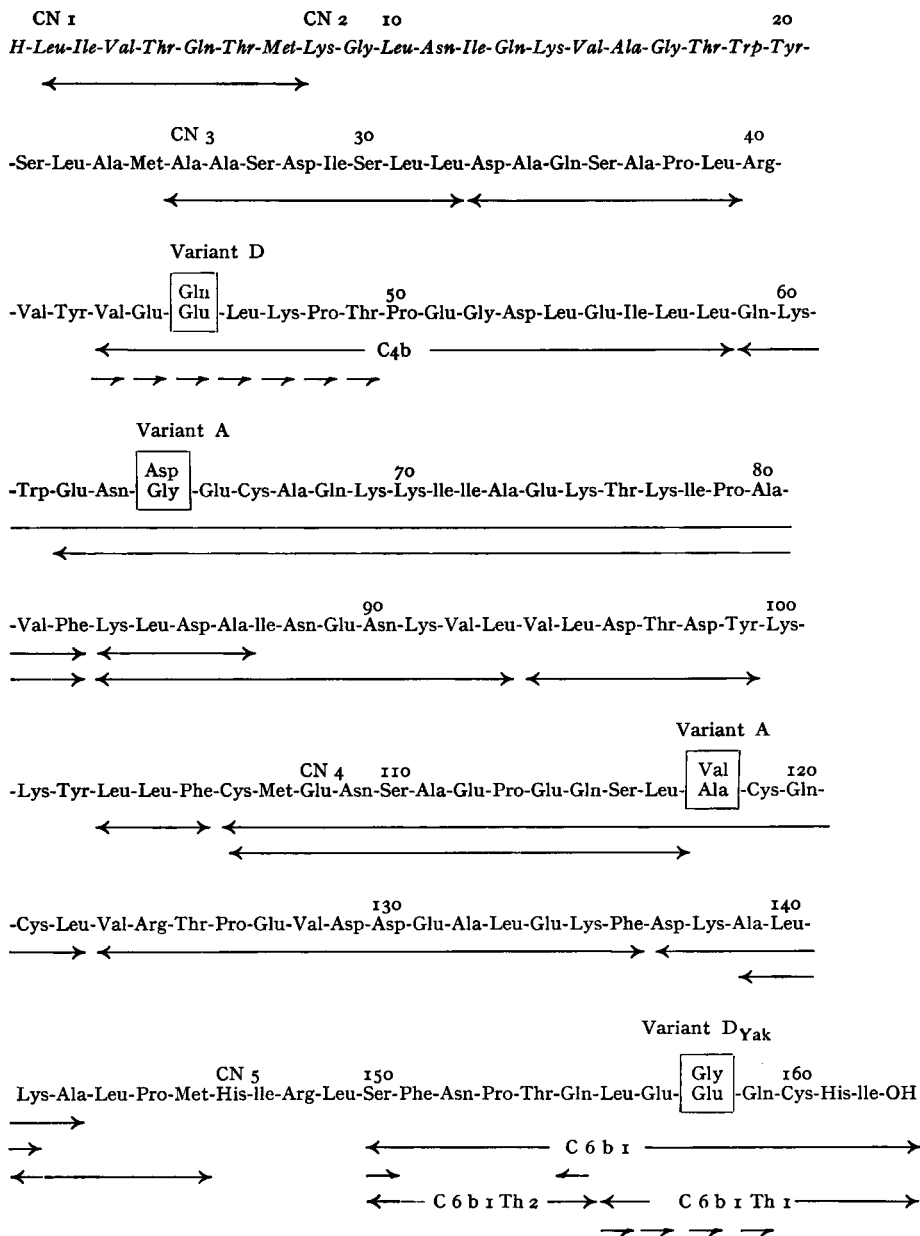


FIG. 2. — Localisation de la substitution d'acides aminés différenciant le variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> du variant  $\beta$ -LgB bovin. La séquence du variant  $\beta$ -LgB bovin est celle de BRAUNITZER *et al.* (1972) avec deux correctifs (voir l'Annexe de ce travail). Les substitutions d'acides aminés qui caractérisent les différents variants sont encadrées. La désignation des peptides CNBr figure au-dessus de leur résidu N-terminal. En italiques : élément de séquence établi à l'aide du Séquenceur;  $\longleftrightarrow$ , sous un élément de séquence : peptide chymotrypsique du variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> purifié au cours de ce travail;  $\longleftarrow$ , acide aminé libéré par la carboxypeptidase A;  $\longrightarrow$ , acide aminé libéré par la leucine aminopeptidase;  $\rightarrow$ , résidu identifié par la méthode d'Edman.

Le peptide C 6 b 1 a été recoupé par la thermolysine (E/S : 1/200; pH 8,0; 40°C; 1 h 30), ce qui a fourni deux peptides, C 6 b 1 Th 1 et C 6 b 1 Th 2, préparés par électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9, et dont la composition figure dans le tableau 4. Le peptide C 6 b 1 Th 1 correspond à l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -lactoglobuline; les résultats de la dégradation d'Edman montrent qu'il diffère de son homologue bovin par la substitution 158 Glu ( $\beta$ -LgB bovin)  $\rightarrow$  Gly ( $\beta$ -LgD du Yak) (tabl. 4 et fig. 2). Cette substitution rend parfaitement compte de la migration électrophorétique relative de la protéine du Yak. Compte tenu du nombre élevé de recouvrements que comportent nos résultats, il est peu vraisemblable que la  $\beta$ -lactoglobuline B bovine et la  $\beta$ -lactoglobuline du Yak puissent présenter d'autres différences.

La  $\beta$ -lactoglobuline de Yak ne peut être distinguée, par électrophorèse, ni à pH alcalin, ni à pH acide, du variant  $\beta$ -LgD bovin. Ces deux protéines diffèrent toutefois du variant  $\beta$ -LgB bovin par des substitutions d'acides aminés différentes puisque le variant  $\beta$ -LgD bovin se caractérise par la substitution 45 Glu ( $\beta$ -LgB)  $\rightarrow$  Gln ( $\beta$ -LgD) (BRIGNON et RIBADEAU-DUMAS, 1973). Il convient donc de les distinguer et nous désignerons la  $\beta$ -lactoglobuline du Yak par  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>.

### 3. — Étude biochimique du variant $\alpha_{s1}$ -CnE

Il se trouve que l'un des trois échantillons de lait récolté, chez des yaks, en quantité voisine d'un litre avait été prélevé chez un sujet homozygote pour la combinaison  $\alpha_{s1}$ -Cn<sup>E</sup>— $\beta$ -Cn<sup>A'</sup>— $\kappa$ -Cn<sup>A</sup>. Environ 1,5 g de caséine  $\alpha_{s1}$ -E ont ainsi pu être purifiés par deux chromatographies successives sur colonne de DEAE-cellulose (MERCIER *et al.*, 1968) à partir de caséine entière provenant de ce lait. Une partie de cette caséine (900 mg) a été hydrolysée par la trypsine (E/S : 1/50; pH 7,8; 1 h 30; 40°C) après maléylation des résidus lysyle, et les peptides ainsi obtenus (peptides « Tm ») ont été purifiés selon le protocole décrit par GROSCLAUDE *et al.* (1970 a). La composition en acides aminés de ces peptides s'est révélée identique à celle des peptides homologues du variant  $\alpha_{s1}$ -CnC, à l'exception de celle du peptide  $\alpha_{s1}$ -ETm 1 qui semble notamment comporter un résidu lysyle en plus. Ce peptide a donc été recoupé, parallèlement, par la trypsine après démaléylation, et par le bromure de cyanogène (CNBr).

#### Hydrolyse par la trypsine.

Les peptides résultant de l'hydrolyse d' $\alpha_{s1}$  E Tm 1 par la trypsine (5  $\mu$ M de peptide; E/S : 1/50; pH 8,6; 1 h 30; 40°C) ont été séparés sur colonne de résine Dowex AG-50 W-X 2 et repurifiés par chromatographie préparative sur papier. La composition en acides aminés de ces peptides est identique à celle de leurs homologues des variants  $\alpha_{s1}$ -CnB ou  $\alpha_{s1}$ -CnC (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 a) à l'exception de celle de deux d'entre eux, Tm 1 T 1 a et Tm 1 T 1 b. Les analyses effectuées sur ces peptides (tabl. 4) suggèrent que la chaîne polypeptidique du variant  $\alpha_{s1}$ -CnE comporte, en position 59, un résidu lysyle au lieu du résidu glutaminyle présent dans les autres variants (fig. 3; pour la nature des résidus 59, 77 et 78 de la caséine  $\alpha_{s1}$ -B ou  $\alpha_{s1}$ -C on se référera au correctif de GROSCLAUDE *et al.*, 1973).

TABLEAU 4  
 Peptides des variants  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>,  $\beta$ -LgB et  $\alpha_{s1}$ -CnE

$\beta$ -lactoglobuline D <sub>Yak</sub>	
<i>Peptide C 6 b 1</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 1,19 (1); Thr, 0,95 (1); Ser, 0,90 (1); Glx, 3,09 (3); Pro, 0,95 (1); Gly, 1,02 (1); Cys/2, 0,37 (1); Ile, 0,95 (1); Leu, 1,17 (1); Phe, 0,95 (1); His, 0,72 (1).
<i>Peptide C 6 b 1 Th 1</i>	
Composition en acides aminés .....	Glx, 2,25 (2); Gly, 1,00 (1); Cys/2, 0,25 (1); Ile, 0,93 (1); Leu, 1,09 (1); His, 0,75 (1).
Leucine aminopeptidase .....	(1,5 $\mu$ l; 24 h) Leu, 0,90; Glu, 0,28.
<i>Peptide C 6 b 1 Th 2</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 0,98 (1); Thr, 0,87 (1); Ser, 0,79 (1); Glx, 1,11 (1); Pro, 1,03 (1); Phe, 0,85 (1).
Carboxypeptidase A.....	(2 $\mu$ l; 24 h) Gln, 1,01.
Leucine aminopeptidase .....	(2 $\mu$ l; 24 h) Ser, 0,81; Phe, non déterminée.
$\beta$ -lactoglobuline B bovine	
<i>Peptide C 6 b 1 Th 1</i>	
Composition en acides aminés .....	Glx, 3,18 (3); Cys/2, 0,93 (1); Ile, 0,89 (1); Leu, 0,98 (1); His, 0,92 (1).
Leucine aminopeptidase .....	(2 $\mu$ l; 24 h) Leu, 0,55; Glu, 0,87.
<i>Peptide C 6 b 1 Th 2</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 0,98 (1); Thr, 0,87 (1); Ser, 0,80 (1); Glx, 1,42 (1); Pro, 0,93 (1); Phe, 0,89 (1).
Carboxypeptidase A.....	(2 $\mu$ l; 24 h) Gln, 0,92.
Leucine aminopeptidase .....	(2 $\mu$ l ; 24 h) Ser, 0,69; Phe, 0,72.
Caséine $\alpha_{s1}$ -E	
<i>Peptide Tm 1 C N 3 (= CN 2)</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 1,12 (1); Glx, 0,96 (1); Ile, 0,88 (1); Lys, 1,70 (2); Homoser, 0,46.
Carboxypeptidases A et B.....	(CPA, 20 $\mu$ l, 18 h; CPB, 20 $\mu$ l, 18 h) Homoser, 0,96; Lys, 2,1; Ile, 0,69.
<i>Peptide Tm 1 T 1 b</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 1,12 (1); Ser, 3,52 (5) *; Glx, 5,79 (6); Pro, 1,02 (1); Ala, 1,00 (1); Val, 1,69 (2); Met, 1,00 (1); Ile, 1,60 (2); Lys, 0,86 (1).
Carboxypeptidases A et B .....	(CPA, 4 $\mu$ l, 6 h) (CPB, 4 $\mu$ l, 24 h) après action de la phosphatase alcaline (4 $\mu$ l, 25 h) Lys, 0,90; Gln, 0,90; Glu, 0,71; Val, 0,63; Ser, 0,15.
<i>Peptide Tm 1 T 1 a</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 1,21 (1); Ser, 3,57 (5) *; Glx, 6,00 (6); Pro, 1,13 (1); Ala, 1,04 (1); Val, 1,97 (2); Met, 0,90 (1); Ile, 1,66 (2); Lys, 1,69 (2).
<i>Peptide Tm 2 T 1 Th 4</i>	
Composition en acides aminés .....	Asx, 1,00 (1); Ser, 1,57 (2); Glx, 1,15 (1); Gly, 1,77 (2); Ile, 0,72 (1); Lys, 0,86 (1).
Carboxypeptidases A et B .....	(CPA, 2 $\mu$ l, 24 h) (CPB, 2 $\mu$ l, 24 h) Lys, 0,67; Gly, 0,13; Ser, traces.

Les quantités d'acides aminés sont exprimées en moles d'acide aminé par mole de peptide; entre parenthèses : valeurs entières proposées. Les quantités d'enzymes sont données en  $\mu$ l de solution commerciale pour 0,1 mole de peptide.

\* Interprétation tenant compte de la forte destruction de la sérine toujours observée pour ce peptide (GROSCLAUDE *et al.*, 1970 a; MERCIER *et al.*, 1970 b).



## DISCUSSION

La présente étude est la première qui donne des informations détaillées sur les types génétiques et le polymorphisme des lactoprotéines du Yak. Elle porte toutefois sur un effectif assez limité, et celles de ses conclusions qui touchent à la présence, à l'absence, ou la fréquence des variants demandent à être confirmées dans d'autres populations.

Le résultat sans doute le plus intéressant de ce travail est celui qui indique que le Yak possède un type de  $\beta$ -lactoglobuline qui lui paraît propre,  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>, et non les variants classiques des bovins et des zébus,  $\beta$ -LgA et B. Le même type de  $\beta$ -lactoglobuline a été retrouvé récemment chez deux yaks de République populaire de Mongolie — les deux seuls dont nous avons pu analyser le lait — ce qui laisse penser que le phénomène observé est bien caractéristique de l'espèce <sup>(1)</sup> (GROSCLAUDE *et al.*, 1975). Le problème se pose alors de savoir si la fixation de ce variant spécifique est due au hasard, ou si, au contraire, le gène correspondant, ou un gène d'un locus étroitement lié, possède un avantage sélectif; on ne peut, pour le moment, apporter de réponse à ce problème d'autant plus qu'on ne connaît pas de fonction biologique à la  $\beta$ -lactoglobuline.

Les variants  $\beta$ -LgD et  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> fournissent l'exemple de deux variants dont les caractéristiques électrophorétiques sont strictement identiques, et qui correspondent pourtant à des mutations différentes. Un autre cas de ce genre est celui des variants  $\beta$ -CnA<sup>3</sup> et  $\beta$ -CnA<sup>3</sup><sub>Mongolie</sub> (GROSCLAUDE, 1975). Ces exemples, qui tendront sans doute à se multiplier à l'avenir, incitent à faire preuve d'une grande prudence dans les études phylogéniques pour lesquelles on ne dispose que de données électrophorétiques.

En ce qui concerne les caséines, et si l'on considère l'unité génétique formée par les loci  $\alpha_{s1}$ -Cn,  $\beta$ -Cn et  $\kappa$ -Cn, on constate que la combinaison la plus fréquente, chez le Yak,  $\alpha_{s1}$ -Cn<sup>C</sup>— $\beta$ -CnA<sup>3</sup>— $\kappa$ -CnA, est la même que chez le Zébu (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a, et ce travail). Ceci tend à rapprocher le Yak des zébus plutôt que des bovins. D'autre part, l'hypothèse selon laquelle cette combinaison allélique serait la combinaison de base du genre *Bos* gagne en vraisemblance. Nous avons par ailleurs montré que le variant  $\alpha_{s1}$ -CnE, découvert et caractérisé au cours de cette étude, dérivait du variant  $\alpha_{s1}$ -CnC et non du variant  $\alpha_{s1}$ -CnB. On voit donc que la combinaison  $\alpha_{s1}$ -CnE— $\beta$ -CnA<sup>3</sup>— $\kappa$ -CnA dérive directement, par mutation, de la combinaison de base  $\alpha_{s1}$ -CnC— $\beta$ -CnA<sup>3</sup>— $\kappa$ -CnA.

Il peut paraître anormal que le variant  $\beta$ -CnA<sup>1</sup> n'ait été trouvé dans aucun des 112 échantillons provenant d'autres types génétiques que le type Yak pur, surtout si l'on admet qu'il est un intermédiaire entre  $\beta$ -CnA<sup>3</sup> et  $\beta$ -CnB (GROSCLAUDE *et al.*, 1972 a) qui sont, eux, présents. Cette situation peut toutefois n'être due qu'au seul fait du hasard, car les effectifs de bovins et de zébus touchés par notre étude sont faibles. Rappelons par ailleurs, au passage, que ce sont les deux échantillons de caséine hétérozygotes pour le variant  $\beta$ -CnD trouvés au cours de ce travail qui nous ont permis de procéder à l'étude biochimique de ce variant (GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a).

<sup>(1)</sup> Les résultats de LOZOVAYA (1973), qui trouve une forte prédominance du variant  $\beta$ -LgB (f : 0,92) chez les yaks du Pamir paraissent contradictoires. Toutefois, cette étude est peu détaillée et appelle certaines réserves.

L'existence d'une  $\beta$ -lactoglobuline et d'un variant de caséine  $\alpha_{s1}$  apparemment spécifiques, et même l'absence de certains variants des bovins ou des zébus chez les yaks ( $\beta$ -CnA<sup>1</sup> et  $\beta$ -CnB), tendent à indiquer que la distance phylogénique séparant *Bos poëphagus* de *Bos taurus* ou de *Bos indicus* est plus grande que celle — d'ailleurs faible (EPSTEIN, 1971; GROSCLAUDE *et al.*, 1974 a) — qui sépare ces deux dernières espèces. Cette tendance sera encore confirmée par l'étude du polymorphisme des caséines  $\alpha_{s2}$  qui a été effectuée à partir des mêmes échantillons (GROSCLAUDE *et al.*, 1976). Cette conclusion concorde avec les observations générales faites sur ces espèces (différences phénotypiques, stérilité des hybrides mâles de yaks et de bovins ou de zébus) et qui ont conduit, dans un premier temps, à classer le Yak en dehors du genre *Bos*.

Le prélèvement des échantillons qui ont fait l'objet de cette étude a été effectué dans le cadre d'une recherche coopérative plus vaste dont l'un des objectifs était d'étudier les méthodes d'élevage et de sélection dans la haute vallée népalaise visitée. On se demandait au départ si les résultats de l'analyse du polymorphisme des lactoprotéines permettraient d'estimer le degré de précision atteint, sur le terrain, dans l'identification des types génétiques. Le fait que les 42 yaks possèdent un variant spécifique de  $\beta$ -lactoglobuline, et qu'à une exception près, les 89 sujets classés comme hybrides F I soient hétérozygotes pour ce variant permet de conclure d'une part que cette identification a été faite correctement, et d'autre part que les éleveurs locaux maîtrisent bien leur système de croisements. Toutefois, ce système n'empêche sans doute pas tout à fait la migration de gènes d'une espèce à l'autre : des exceptions comme celle qui a été mentionnée ci-dessus peuvent s'expliquer par le fait qu'à partir d'un certain nombre de générations un sujet provenant par croisements de retour successifs d'une femelle F I doit être considéré comme étant d'espèce pure. Cependant, nos résultats indiquent, dans leur ensemble, que cette migration génique a une très faible incidence, et cette observation permet, à son tour, d'accepter avec une certaine confiance les conclusions d'ordre génétique du présent travail.

*Reçu pour publication en novembre 1976.*

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les personnes dont la compréhension et l'aide ont rendu possible la collecte puis l'acheminement dans de bonnes conditions jusqu'à Jouy-en-Josas des échantillons de lait utilisés pour la réalisation de l'ensemble de ce travail (parties I et II) :

- les autorités népalaises, et M. TOUSSAINT, ambassadeur de France à Kathmandu ;
- M. C. JEST, ethnologue (Centre national de la Recherche scientifique), responsable de la RCP 253, dont l'aide sur le terrain nous a été très précieuse pour l'identification des animaux dans le terminologie locale ;
- M. A. MAIRE, botaniste (Centre universitaire de Savoie, Chambéry).

## SUMMARY

### LACTOPROTEIN POLYMORPHISM IN NEPALESE BOVINAE

#### I. — EVIDENCE, IN THE YAK, AND BIOCHEMICAL CHARACTERISATION, OF TWO NEW VARIANTS : $\beta$ -LACTOGLOBULIN D<sub>Yak</sub> AND $\alpha_{s1}$ -CASEIN E

A study of the genetic polymorphism of  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin has been carried out from the individual milks of 156 females of the genus *Bos*, bred



in a high Nepalese valley, that were of the following genetic types : 42 yaks, 7 bovine, and 107 various hybrids, including 55 F 1 of type ♂ Yak × ♀ Zébu, 17 F 1 of type ♂ Bovine × ♀ Yak and 15 F 1 of type ♂ (Bovine × Zébu) × ♀ Yak. This work makes possible a comparison of the electrophoretic variants of the milk proteins of the Yak (*Bos poëphagus* or *Bos grunniens*) with those, already well identified, of bovine (*Bos taurus*) and zebu (*Bos indicus*).

The 42 yaks all possess only one  $\alpha$ -lactalbumin type, identical, in electrophoresis, to the bovine or zebu  $\alpha$ -LaB variant, and only one  $\beta$ -lactoglobulin type, identical to the bovine  $\beta$ -LgD variant. However, this Yak  $\beta$ -lactoglobulin differs from bovine  $\beta$ -LgB by a substitution different from the one that characterises bovine  $\beta$ -LgD [158 Glu ( $\beta$ -LgB)  $\rightarrow$  Gly (Yak  $\beta$ -LgD) instead of 45 Glu ( $\beta$ -LgB)  $\rightarrow$  Gln (Bovine  $\beta$ -LgD)]. It is thus a type not yet described, that seems to be specific to the Yak; this type is called  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>.

At the  $\alpha_{81}$ -Cn locus, a hitherto unknown variant, slower than  $\alpha_{81}$ -CnC at alkaline pH, and faster at acid pH, has been found. This variant, called  $\alpha_{81}$ -CnE, differs from  $\alpha_{81}$ -CnC by the substitution 59 Gln ( $\alpha_{81}$ -CnC)  $\rightarrow$  Lys ( $\alpha_{81}$ -CnE); it seems specific to the Yak, and has a frequency of 0,35 among the 42 females whose milk was analysed, as compared to 0,63 for  $\alpha_{81}$ -CnC and 0,02 for  $\alpha_{81}$ -CnB. At the  $\beta$ -Cn locus, the 42 yaks are homozygous for the allele  $\beta$ -Cn<sup>A</sup>, and, at the  $\kappa$ -Cn locus, one finds only the two variants already encountered in bovine and zebu,  $\kappa$ -CnA, that predominates (0,93) and  $\kappa$ -CnB (0,07). The allelic combination  $\alpha_{81}$ -CnC— $\beta$ -Cn<sup>A</sup>— $\kappa$ -Cn<sup>A</sup> is the most frequent among these yaks (0,61), which tends to make them closer to zebu than to bovine.

In addition, two corrections are given, in an Annex, to the amino acid sequence of  $\beta$ -lactoglobulin as published by BRAUNITZER *et al.* (1972).

## ANNEXE

### *Deux correctifs à la séquence des acides aminés de la $\beta$ -lactoglobuline bovine établie par BRAUNITZER *et al.* (1972)*

Les résultats de l'étude biochimique du variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub> nous ont conduit à rechercher et à corriger deux erreurs dans la séquence des acides aminés de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine, publiée par BRAUNITZER *et al.* (1972). Nos investigations ont porté sur la  $\beta$ -lactoglobuline d'une vache homozygote pour le variant  $\beta$ -LgB, qui a été purifiée par la technique d'ASCHAFFENBURG et DREWRY (1957). Les deux correctifs portent sur des résidus communs aux variants  $\beta$ -LgA,  $\beta$ -LgB et  $\beta$ -LgD.

a) La séquence N-terminale de la  $\beta$ -lactoglobuline B bovine a été établie à l'aide du Séquenceur. Comme dans le variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>, l'acide aminé situé en onzième position de la chaîne polypeptidique est une asparagine (Asn) et non pas un acide aspartique (Asp) (fig. 2). Cette discordance entre nos résultats et ceux de BRAUNITZER *et al.* ne peut s'expliquer en supposant que les analyses ont porté sur des variants différents, mais non identifiables par électrophorèse, puisque la substitution Asp/Asn serait précisément détectable par électrophorèse. L'erreur de BRAUNITZER *et al.*, est sans doute due à une déamidation du résidu asparaginyne considéré.

b) Dans la séquence C-terminale de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine, comme dans celle du variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>, le résidu 155 est une glutamine, le résidu 156 une leucine et non l'inverse comme l'ont donné BRAUNITZER *et al.* Ce résultat a été vérifié en isolant les peptides LgD C 6 b 1 Th 1 et C 6 b 1 Th 2 par les techniques déjà utilisées pour séparer les peptides homologues du variant  $\beta$ -LgD<sub>Yak</sub>. La composition en acides aminés de ces peptides, et les résultats de leur hydrolyse par les exopeptidases sont donnés dans le tableau 3. La différence entre nos résultats et ceux de BRAUNITZER

et al. portant ici sur une interversion, il est peu vraisemblable qu'elle puisse s'expliquer autrement que par une erreur de ces auteurs.

Ces deux correctifs ont été pris en compte dans la séquence des acides aminés de la  $\beta$ -lactoglobuline donnée dans la figure 2.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASCHAFFENBURG R., 1968. Genetic variants of milk proteins; their breed distribution. *J. Dairy Res.*, **35**, 447-460.
- ASCHAFFENBURG R., DREWRY J., 1957. Improved method for the preparation of crystalline  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from cow's milk. *Biochem. J.*, **65**, 273-277.
- ASCHAFFENBURG R., DREWRY J., 1959. *New procedure for the routine determination of the various non casein proteins in milk.* XV<sup>e</sup> Cong. Intern. Lait, **3**, Sect. 5, 1631-1637.
- ASCHAFFENBURG R., MICHALAK W., 1968. Simultaneous phenotyping procedure for milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **51**, 1849.
- BELL K., HOPPER K. E., MCKENZIE H. A., MURPHY W. H., SHAW D. C., 1970. A comparison of bovine  $\alpha$ -lactalbumin A and B of Droughtmaster. *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 437-447.
- BELL K., MCKENZIE H. A., SHAW D. C., 1968. Amino acid composition and peptide maps of  $\beta$ -lactoglobulin variants. *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 284-294.
- 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.
- BONNEMAIRE J., 1976. Le yak domestique et son hybridation. *Ethnozootéchnie*, **15**, 46-77.
- BONNEMAIRE J., TEISSIER J. H., 1973. *Rapport sur une mission de recherche effectuée au Népal entre septembre et octobre 1972.* Rapport ronéotypé, pp. 24.
- BONNEMAIRE J., TEISSIER J. H., 1976. Quelques aspects de l'élevage en haute altitude dans l'Himalaya Central : yaks, bovins, hybrides et métis dans la vallée du Langtang (Népal). *Ethnozootéchnie*, **15**, (sous presse).
- BRAUNITZER G., CHEN R., SCHRANK B., STANGL A., 1972. Automatische Sequenzanalyse eines Proteins ( $\beta$ -lactoglobulin AB). *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  $\alpha$ -Lactalbumin. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4570-4582.
- BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Localisation dans la chaîne peptidique de la  $\beta$ -Lactoglobuline bovine de la substitution Glu/Gln différenciant les variants génétiques B et D. *FEBS Lett.*, **33**, 73-76.
- 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.
- DENISOV V. F., 1958. *Les yaks domestiques et leurs hybrides* (Russe). Moscou, Seljhozgis. pp. 116.
- EPSTEIN H., 1969. *Domestic animals of China.* Commonwealth agricultural Bureaux, Edinburgh, pp. 165.
- EPSTEIN H., 1971. *The origin of the domestic animals of Africa.* Africana publishing Corporation, New York, London, Munich, **1**, pp. 573.
- EPSTEIN H., 1974. Yak and Chauri. *Wld Anim. Rev.* (FAO), **9**, 8-12.
- GROSCLAUDE F., 1974. *Analyse génétique et biochimique du polymorphisme électrophorétique des caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  chez les bovins (Bos taurus) et les zébus (Bos indicus).* Thèse de doctorat d'État-ès-Sciences, Paris.
- GROSCLAUDE F., 1975. Variants génétiques des protéines du lait de vaches mongoles. *Études Mongoles, Cahier du Centre d'études mongoles*, Laboratoire d'Ethnologie, Université de Paris X-Nanterre, **6**, 81-83.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., ACCOLAS J. P., 1975. (Résultats non publiés).
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., 1974. a Comparaison du polymorphisme génétique des lactoprotéines du Zébu et des bovins. *Ann. Génét. Sélect. anim.*, **6**, 305-329.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., BONNEMAIRE J., TEISSIER J. H., 1976. Polymorphisme des lactoprotéines de bovins Népalais II. Polymorphisme des caséines  $\alpha$  mineures ; le locus  $\alpha_{S2}$ -Cn est-il lié aux loci  $\alpha_{S1}$ -Cn,  $\beta$ -Cn et  $\kappa$ -Cn? *Ann. Génét. Sélect. anim.*, **8**, 481-491.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., MERCIER J. C., RIBADEAU-DUMAS B., 1972 a. Caractérisation des variants génétiques des caséines  $\alpha_{S1}$  et  $\beta$  bovines. *Eur. J. Biochem.*, **28**, 328-337.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ 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  $\kappa$  bovine. *Ann. Génét. Sélect. anim.*, **4**, 515-521.

- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Structure primaire de la caséine  $\alpha_{S1}$  et de la caséine  $\beta$  bovines. Correctif. *Eur. J. Biochem.*, **40**, 323-324.
- GROSCLAUDE F., MAHÉ M. F., VOGLINO G. F., 1974 b. Le variant  $\beta$ E 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  $\alpha_{S1}$  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  $\alpha_{S1}$  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., GARNIER J., RIBADEAU-DUMAS B., 1966. Mise en évidence de deux variants supplémentaires des protéines du lait de vache :  $\alpha_{S1}$ -CnD et LgD. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **6**, 215-222.
- HUANG W. Y., TANG J., 1970. Carboxyl-terminal sequence of human Gastricsin and Pepsin. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2189-2193.
- LOZOVAYA G. S., 1973. Polymorphisme de l'hémoglobine, de la transferrine et de la  $\beta$ -lactoglobuline chez des yaks du Pamir (Russe). *Tsitologiya i Genetika*, **7**, 158-160.
- MERCIER J. C., ADDEO F., PELISSIER J. P., 1976. Structure primaire du caséinomacropeptide de la caséine  $\kappa$  caprine. *Biochimie*, **58**, 1303-1310.
- MERCIER J. C., BRIGNON G., RIBADEAU-DUMAS B., 1973. Structure primaire de la caséine  $\kappa$ B bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **35**, 222-235.
- MERCIER J. C., MAUBOIS J. L., POZNANSKI S., RIBADEAU-DUMAS B., 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE-cellulose en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 521-530.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 a. Structure primaire de la caséine  $\alpha_{S1}$  bovine. Séquence des 48 résidus d'acides aminés de l'extrémité COOH-terminale. *Eur. J. Biochem.*, **14**, 108-119.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1970 b. Structure primaire de la caséine  $\alpha_{S1}$ . Enchaînement des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène et des peptides résultant de l'hydrolyse tryptique de la caséine  $\alpha_{S1}$  maléylée. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 439-446.
- MERCIER J. C., GROSCLAUDE F., RIBADEAU-DUMAS B., 1971. Structure primaire de la caséine  $\alpha_{S1}$  bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **23**, 41-51.
- 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  $\beta$ -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., BRIGNON G., GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., 1971 a. Structure primaire de la caséine  $\beta$  bovine. Enchaînement de 32 résidus d'amino-acides 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  $\beta$  bovine. Séquence complète. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 504-514.
- RIBADEAU-DUMAS B., GROSCLAUDE F., MERCIER J. C., 1971 b. Structure primaire de la caséine  $\beta$  bovine. Enchaînement des peptides tryptiques et des peptides obtenus par action du bromure de cyanogène. *Eur. J. Biochem.*, **18**, 252-257.
- SCHULTHESS W., 1967. Yak und Tsauri in Nepal. *Wld Rev. Anim. Prod.*, **3**, N° 13, 88-97.
- 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  $\kappa$ -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.