

PROGRES RECENTS DANS LA BIOCHIMIE

DES PROTEINES DU LAIT

Bruno RIBADEAU-DUMAS

Laboratoire de Recherches sur les Protéines
Institut National de la Recherche Agronomique
C.N.R.Z., 78 350 JOUY-EN-JOSAS France.

L'état des recherches concernant les protéines du lait n'avait été que très brièvement évoqué au dernier Congrès International de Laiterie en 1974, dans le cadre d'un exposé plus général du Dr. Shahani. Si nous nous proposons de mettre l'accent sur les principaux résultats obtenus dans ce domaine durant les 4 années passées, il nous faudra néanmoins rappeler des données importantes postérieures à 1970, époque à laquelle le Dr. Mc Kenzie avait passé en revue le sujet dans le cadre du 18^e Congrès International de Laiterie. Pour tout ce qui a été fait antérieurement, on pourra se rapporter aux deux volumes de l'ouvrage "Milk Proteins", publié en 1971 par le même auteur (Mc Kenzie, 1971). Une revue concernant les protéines du lait humain a été publiée récemment (Bezkorovainy, 1977).

Il n'est pas dans notre intention de passer ici en revue toutes les connaissances acquises ces dernières années dans le domaine des protéines du lait mais, à partir des résultats qui nous semblent les plus significatifs, de tenter de répondre aux 3 questions que le chercheur ou l'utilisateur se pose à propos de ces protéines : D'où viennent-elles ? Que sont-elles ? A quoi servent-elles ?

1. D'OU VIENNENT LES PROTEINES DU LAIT ?

Les protéines alimentaires sont dégradées en acides aminés dans le tractus digestif. Transportés par la voie sanguine vers leurs lieux d'utilisation, ces acides aminés constituent la matière première de toutes les protéines corporelles. L'un de ces lieux, chez le mammifère en lactation, est la glande mammaire. Chez la vache, celle-ci renferme un grand nombre de petites alvéoles, les acini, entourées chacune d'une couche de cellules sécrétrices, et toutes connectées, par une série de canaux, au canal du trayon par lequel s'écoule le lait qui provient des cellules sécrétrices. La figure 1 montre le schéma d'une de ces cellules telles qu'on peut les voir au microscope électronique. Les acides aminés sont conduits à la cellule par les capillaires sanguins sous-jacents à la membrane basale qu'ils traversent pour pénétrer dans la cellule. Dans celle-ci la biosynthèse de protéines à partir des acides aminés a lieu comme dans toute autre cellule. Nous n'en décrirons que quelques caractéristiques. Les ribosomes, sur lesquels sont synthétisés les protéines du lait à partir de l'information génétique provenant du noyau de la cellule (à chaque protéine y correspond un fragment d'ADN appelé "gène de structure"), sont fixés sur le réticulum endoplasmique,

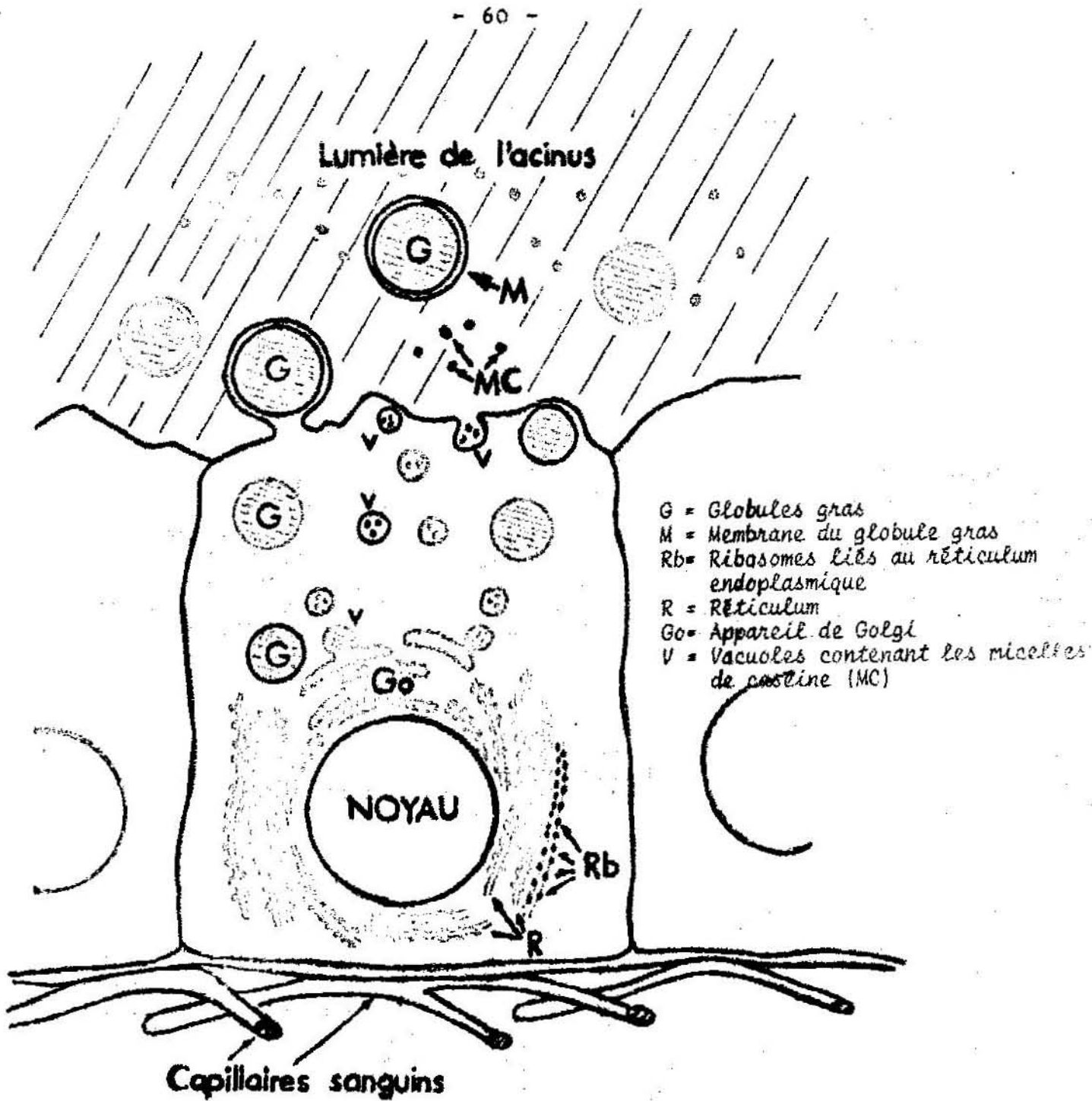


Figure 1. Schéma d'une cellule sécrétrice mammaire en activité

comme c'est le cas pour toute protéine devant être excrétée par une cellule. Le reticulum est un réseau complexe de canalicules limitées par une membrane lipo-protéique, communiquant avec un empilement de saccules aplatis qui surmontent le noyau, l'appareil de Golgi. Aussitôt synthétisées sur les ribosomes, les protéines pénètrent dans le reticulum et migrent vers l'appareil de Golgi où a lieu, pour certaines d'entre elles, addition de groupements phosphates ou glycosidiques (Bingham & al, 1972). Des vacuoles contenant des protéines se détachent du Golgi, migrent vers le pôle apical de la cellule sécrétrice et déversent leur contenu dans l'acinus. Dès la séparation des vacuoles du Golgi, on peut y apercevoir au microscope électronique 1 à 3 micelles de caséines par vacuole.

On s'est demandé depuis longtemps pourquoi certaines protéines, celles qui étaient excrétées, pénétraient dans le réticulum alors qu'il n'en était pas de même pour les autres protéines cellulaires. Un élément de réponse essentiel a été apporté à cette question par Milstein & al (1972). Il semble maintenant que les chaînes peptidiques synthétisées sur les ribosomes liés soient toujours plus longues que les protéines excrétées correspondantes. La molécule fraîchement synthétisée (ou pré-protéine) possède, à sa partie NH_2 terminale un segment de 15 à 30 acides aminés (extra-pièce) très apolaire, ayant donc une forte affinité pour les lipides. Ce segment permettrait le passage de la pré-protéine à travers la membrane lipo-protéique du réticulum, et l'extra-pièce serait par la suite éliminée sous l'action d'une protéase spécifique (Fig. 2).

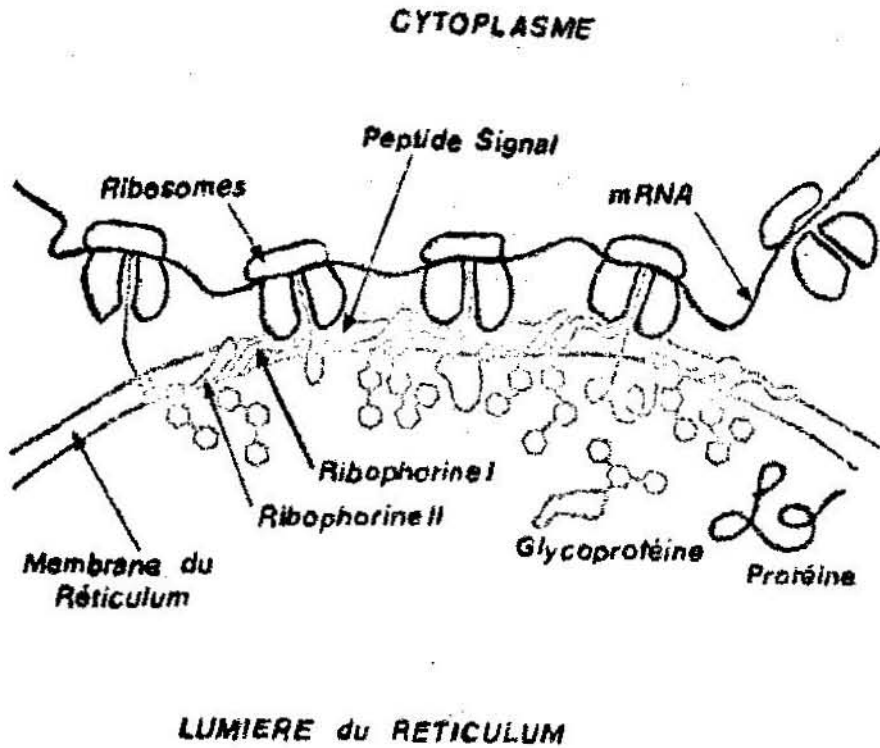
Il a été montré très récemment que les 6 protéines majeures synthétisées dans la glande mammaire (les 4 caséines, α_{s1} α_{s2} β et κ , la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine) sont de même synthétisées sous forme de préprotéines dont les structures sont maintenant connues (Gaye & al, 1977 ; Mercier & al, 1978 a et b) (Fig. 3).

L'excrétion des lipides du lait par la cellule sécrétrice a lieu suivant un processus assez différent. Des gouttelettes lipidiques apparaissent dans le cytoplasme et se déplacent vers le pôle apical de la cellule où ils traversent la membrane en s'en entourant (Fig. 1). Ainsi les globules gras, dans le lait, sont couverts d'une membrane qui représente en fait une fraction de membrane cellulaire, formée de lipides et de protéines.

Nous avons vu qu'à chaque protéine correspond, dans le noyau de la cellule, un gène de structure, formé d'un fragment d'ADN. L'ADN est un constituant des chromosomes. Dans les cellules des mammifères, chaque chromosome existe en double exemplaires. Un exemplaire provient du père, l'autre de la mère. Il arrive parfois qu'un gène soit l'objet d'une mutation. Celle-ci entraîne généralement une modification ponctuelle qui se traduit, au niveau de la protéine codée par ce gène, par le remplacement d'un acide aminé par un autre acide aminé. Si cette mutation a lieu dans une cellule germinale, l'une des paires de chromosomes qui se retrouveront dans l'oeuf sera formée de 2 chromosomes différant très légèrement, portant l'un le gène initial, l'autre le gène muté. Toutes les cellules de l'organisme, dont celles de la glande mammaire, auront cette particularité. Les 2 gènes homologues A et B (appelés alors allèles) ne conduiront plus à la synthèse de la même protéine, mais à celle de 2 "variants génétiques". L'animal est dit "hétérozygote" pour le gène considéré. Suivant les lois de la génétique mendélienne, sa descendance sera formée d'individus homozygotes pour l'un ou l'autre gène (leurs cellules contiendront toutes soit A, soit B), ou hétérozygotes (toutes leurs cellules contiendront A et B).

Figure 2

Mécanisme d'entrée des précurseurs
des protéines du lait dans la lumière du réticulum
endoplasmique



PRE-LACTOPROTEINS (PRECURSORS)

AUTHENTIC LACTOPROTEINS

CLEAVAGE SITE

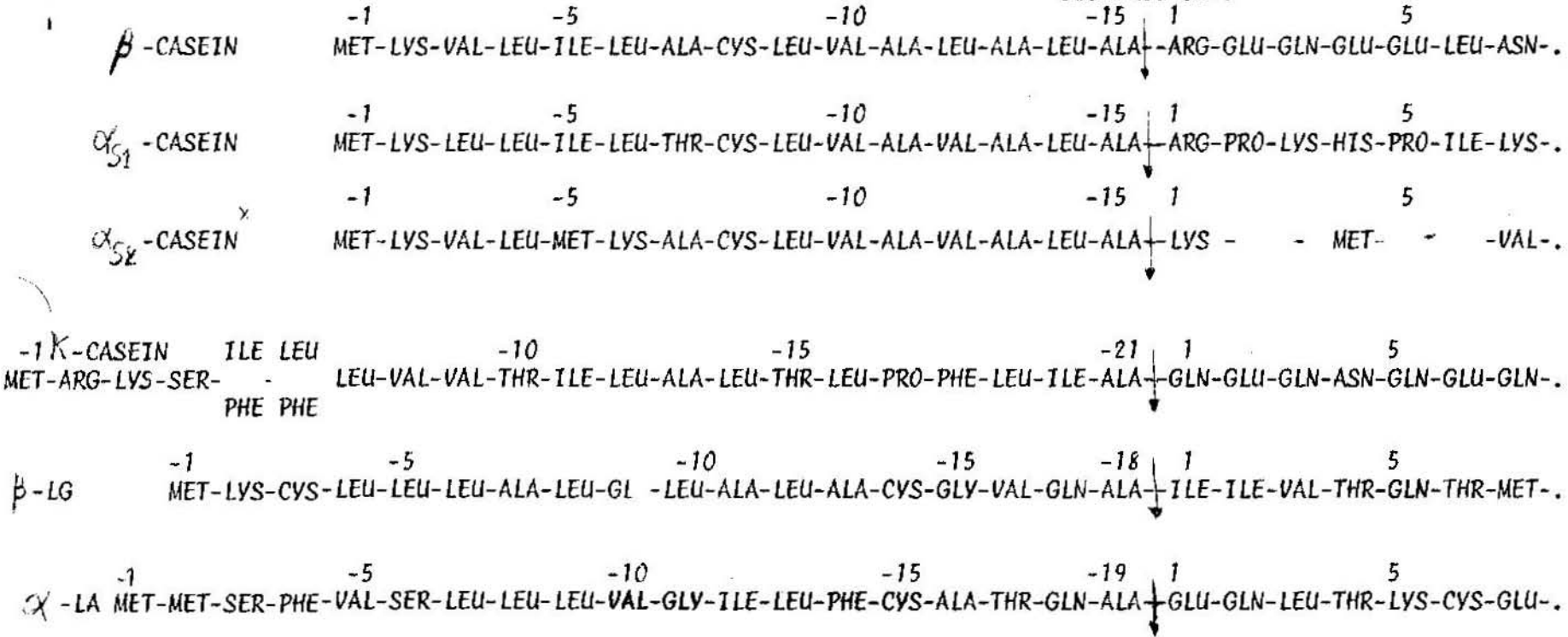


Figure 3 : AMINO TERMINAL SEQUENCES OF THE PRECURSORS (PRE-PROTEINS) OF THE SIX OVINE LACTOPROTEINS.

(d'après Gaye & al., 1977 ; Mercier et al., 1978a, 1978b).

L'existence de variants génétiques parmi les protéines du lait a été mise en évidence par Aschaffenburg et Drewry (1955). L'étude de ces variants a été poursuivie par Aschaffenburg (1963), Kiddy & al (1964), King & al (1965), Larsen et Thymann (1966) et surtout Grosclaude & al (1964, 1966, 1972, 1976, 1978). Des études de populations et de descendance ont montré que les gènes codant pour les 4 caséines bovines étaient probablement situés très près les uns des autres sur le même chromosome (Grosclaude & al, 1972, 1978).

2. CONNAISSANCES ACTUELLES DES PROTEINES DU LAIT

Les connaissances acquises avant 1971 ont été revues par Mc Kenzie (1971). Des progrès considérables ont été acquis depuis lors.

On distingue encore classiquement les caséines, constituants des micelles, et les protéines du lactosérum, cette classification correspondant à des structures et des rôles biologiques très différents de ces 2 groupes de protéines. On peut également classer les protéines du lait en protéines synthétisées dans la glande mammaire (caséines, α -lactalbumine, β -lactoglobuline, lactoferrine, lactoperoxydase) et en protéines provenant du sang (serum albumine, transferrine, lysozyme, plasmine etc...), les immunoglobulines constituant un groupe à part dont certains éléments proviennent de la glande mammaire et d'autres du sang (Lovenstein & al, 1975).

2.1. - Caséines

Les études génétiques citées plus haut, l'élucidation de la structure primaire de toutes les caséines bovines (Mercier & al, 1971 ; Ribadeau-Dumas & al ; 1972 ; Mercier & al, 1973 ; Brignon et al, 1977) et de leurs précurseurs (Gaye & al, 1977) ont apporté des connaissances fondamentales concernant l'origine et la structure des différents constituants de la caséine entière. Tous les composants de la caséine entière (et par là même leurs précurseurs) sont codés par 4 gènes de structure différents, α_{s1} -Cn, α_{s2} -CN, β -CN et κ -Cn, qui gouvernent la synthèse de 4 chaînes peptidiques différentes correspondant respectivement aux caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ .

L'homologie étroite qui a été observée entre les structures primaires des extra-pièces des caséines α_{s1} , α_{s2} et β , les caséines sensibles au calcium, suggère pour ces trois protéines une origine phylogénique commune (Gaye & al, 1977).

2.1.1. - Caséine α_{s1}

La structure primaire de la caséine α_{s1} bovine a été élucidée par Mercier & al (1971). Cinq variants génétiques (α_{s1}^A , B, C, D, E) de cette protéine ont été découverts parmi les espèces du genre Bos (Bovins, zébus, yaks). Les substitutions d'acides aminés qui les différencient ont toutes été localisées (Grosclaude et al, 1976). Le variant A se distingue des autres par une délétion de 13 résidus d'acides aminés (position 1 à 26 de la chaîne peptidique du variant B) (Grosclaude & al, 1970). Chez les bovins, la caséine α_{s1} existe sous deux formes appelées jusqu'ici α_{s0} et α_{s1} (Annan et Manson, 1969), la forme α_{s1} étant prédominante. Ces deux formes possèdent des chaînes peptidiques identiques auxquelles sont liés respectivement 9 et 8 groupements phosphates. Le groupement phosphate supplémentaire de la chaîne peptidique de la caséine α_{s0} a été récemment localisé par Manson & al (1977) en position 41.

Chez le buffle, Addeo & al (1977) ont identifié et analysé 2 formes de caséine α_{s1} , de chaînes peptidiques identiques, présentes en proportions à peu près égales, et renfermant respectivement 7 et 8 groupements phosphates. Ils ont établi la séquence partielle des 45 résidus N-terminaux, qui diffère de celle de la caséine α_{s1} bovine par au moins 2 substitutions, et des résidus C-terminaux, identique à celle de l'homologue bovin.

La caséine α_{s1} de brebis a été isolée et sa composition en acides aminés déterminée par plusieurs auteurs (Resmini & al, 1967 ; Shalichev et Tanev, 1973 ; Richardson et Creamer, 1976). Les travaux de ces derniers font apparaître la présence de 2 formes de caséine α_{s1} , en proportions sensiblement égales, dans le lait de brebis. Ces deux protéines ont des compositions en acides aminés voisines et pourraient ne différer que par leur teneur en phosphore. Des variants génétiques de la caséine α_{s1} ovine ont été mis en évidence par Macha et Horak (1972) et Arave & al (1973).

De la caséine entière de chèvre, Boulanger (1977) a isolé et caractérisé par sa composition en acides aminés et l'étude de ses extrémités N- et C-terminales une caséine α_{s1} , qui semble exister chez tous les individus sous plusieurs formes phosphorylées à des degrés divers. Trois variants génétiques de cette protéine ont été mis en évidence dans cette étude.

La structure primaire de l'extra-pièce de la pré-caséine α_{s1} ovine a été récemment élucidée par Gaye & al (1977). Ce fragment peptidique est constitué de 15 résidus d'acides aminés, dont 5 résidus leucyles, 1 résidu cystéyle et, comme chez tous les précurseurs connus, 1 résidu méthionyle N-terminal.

2.1.2. - Caséine α_{s2} .

Le groupe des caséines α_s bovines a fait l'objet d'une étude approfondie en 1969. Dans ce travail, Annañ et Manson (1969) ont montré que ce groupe était constitué d'au moins 7 protéines qu'ils ont dénotées α_{s0} à α_{s6} (jusqu'alors les fractions α_{s3} et α_{s4} de Manson avaient été dénommées α_{s2} et α_{s3}). La caséine α_{s0} et surtout la caséine α_{s1} ont fait l'objet d'études détaillées dont nous venons de parler.

Nous avons déjà isolé en 1968 les caséines α_{s3} et α_{s4} , proposé pour chacune d'elles la même séquence C-terminale (Ribadeau-Dumas, 1968), déterminé leurs masses moléculaires et leurs compositions en acides aminés (Ribadeau-Dumas, 1970). Ces masses moléculaires et ces compositions paraissaient identiques. Hoagland et al (1971) isolaient peu après les composants α_{s3} , α_{s4} et α_{s5} . Pour les 2 premiers, les masses moléculaires et les compositions en acides aminés qu'ils déterminaient étaient très voisines de nos résultats. Ils montraient en outre que la caséine α_{s5} donnait par réduction les composants α_{s3} et α_{s4} en quantités apparemment équimoléculaires. Ils en concluaient que la fraction α_{s5} était composée d'une molécule de caséine α_{s2} liée par au moins une liaison disulfure à une molécule de caséine α_{s4} . Un certain nombre de propriétés intéressantes de la caséine α_{s5} ont été décrites par Toma et Nakai (1973). Cette protéine, qui est plus sensible au calcium que la caséine α_{s1} , est stabilisée par la caséine vis à vis des ions Ca^{++} , mais à un degré moindre que la caséine α_{s1} .

Les caséines α_{s2} , α_{s3} , α_{s4} et α_{s6} ont été isolées ; il a été montré qu'elles avaient la même composition en acides aminés, la même masse moléculaire, la même séquence C-terminale et qu'elles produisaient, après hydrolyse trypsique, des cartes peptidiques très voisines. De plus, l'analyse séquentielle automatique

effectuée sur le mélange des 4 fractions ne révélait qu'une unique séquence N-terminale, identique à celle de la caséine α_{s3} isolée. Les 4 protéines semblaient donc avoir des chaînes peptidiques identiques. Par contre leurs teneurs en phosphore étaient différentes (de 10 à 13 atomes de phosphore par molécule) (Brignon & al, 1976).

La structure primaire complète de la chaîne peptidique a été déterminée sans ambiguïté (Brignon & al, 1977) sur un mélange des 4 caséines, démontrant l'identité des chaînes peptidiques (Fig. 4). Brignon & al (1972) ont alors proposé le nom de caséine α_{s2} pour l'ensemble des 4 fractions.

La caséine α_{s2} est constituée d'une chaîne peptidique unique de 207 résidus d'acides aminés dont 2 résidus cysteïles. La masse moléculaire varie de 25.150 à 25.390 selon le nombre de groupements phosphates (10 à 13) que porte la chaîne peptidique. Elle se caractérise par une hydrophobicité et une teneur en proline plus basses que les 3 autres caséines. Deux segments de 76 résidus appartenant à la chaîne peptidique présentent une homologie assez prononcée (38% de résidus identiques), suggérant que la duplication d'un gène primitif est à l'origine de la caséine α_{s2} .

Les groupements phosphates n'ont pas encore été localisés avec certitude dans les 4 fractions. La plus phosphorylée renferme un résidu de phosphothréonine. Il est certain qu'outre les 4 fractions majeures de la caséine α_{s2} existent des fractions mineures plus ou moins phosphorylées que ces dernières, dont une contenant un résidu phosphothréonyle supplémentaire.

Un polymorphisme de la caséine α_{s2} a été récemment découvert et étudié (Grosclaude & al, 1976) dans les laits de yaks, bovins et zébus d'une haute vallée népalaise. En plus du variant classique A, 2 autres variants ont été trouvés : $\alpha_{s2}B$ chez les bovins et des zébus et $\alpha_{s2}C$ chez des yaks. Ce dernier a été trouvé également dans des yaks de Mongolie. Des études de populations semblaient indiquer un possible linkage du locus α_{s2} -Cn avec le groupe de gènes α_{s2} -Cn, β -Cn, κ -Cn. Plus récemment (Grosclaude & al, 1978) trouvaient un variant additionnel, $\alpha_{s2}D$, dans 2 races françaises : Vosgienne et Montbéliarde. Ce variant a une mobilité électrophorétique à pH alcalin inférieure à celle du variant $\alpha_{s2}C$. Tous ces variants de la caséine α_{s2} sont, comme le variant classique A, constitués de plusieurs formes dont les mobilités électrophorétiques sont également affectées par les modifications qui les différencient. Ceci est une preuve supplémentaire de la présence d'un gène de structure unique codant une chaîne peptidique plus ou moins modifiée par des phosphorylations post-transcriptionnelles. L'étude de la structure primaire d'une fraction du variant $\alpha_{s2}D$ (Grosclaude & al, 1978) a montré que cette protéine différait du variant A par une délétion de 9 résidus, comprenant un groupe de 4 résidus phosphoséryles (en position 52-60 ou 51-59). Une étude génétique de ce variant rare a confirmé que le locus α_{s2} -Cn est étroitement lié aux loci codant les 3 autres caséines.

Addeo & al (1977) ont isolé du lait de buffle et analysé 2 formes de caséine α_{s2} présentes en quantités équivalentes, de compositions en acides aminés identiques et ne différant probablement que par leur teneur en phosphore. La séquence N-terminale des 10 premiers résidus de cette protéine semble identique à celle de la caséine α_{s2} bovine, à l'exception d'une substitution en position 2. Les séquences des 5 résidus C-terminaux sont identiques dans les 2 espèces.

8 Kozlowski, D., and J. J. Fox. *Journal of Dairy Science* 41: 1111-1115 (1958).
1000 815 201 101

9 Kozlowski, D., and J. J. Fox. *Journal of Dairy Science* 41: 1116-1120 (1958).
1000 815 201 101

10 Kozlowski, D., and J. J. Fox. *Journal of Dairy Science* 41: 1121-1125 (1958).
1000 815 201 101

11 Kozlowski, D., and J. J. Fox. *Journal of Dairy Science* 41: 1126-1130 (1958).
1000 815 201 101

12 Kozlowski, D., and J. J. Fox. *Journal of Dairy Science* 41: 1131-1135 (1958).
1000 815 201 101

13 Kozlowski, D., and J. J. Fox. *Journal of Dairy Science* 41: 1136-1140 (1958).
1000 815 201 101

Figure 4. Séquence complète de la caséine α_2 bovine
(Orlagon & al, 1973)

□, sites potentiels de phosphorylation ; ■, sites connus phosphorylés
dans la caséine α_2 entière.

Une seule fraction de type α_s a été isolée du lait de chèvre et analysée par Richardson et Creamer (1975)^s. Cette protéine est manifestement une caséine α_{s2} , comportant 7 groupements phosphates. Boulanger (1977) a fait une étude détaillée de 942 échantillons de laits individuels de chèvre et y a mis en évidence (par analyse d'acides aminés et étude de l'extrémité C-terminale) une caséine α_{s2} toujours présente sous au moins 2 formes différant par leur degré de phosphorylation et a démontré l'existence de 2 variants génétiques de cette protéine.

Opérant sur un mélange de précurseurs de caséines α_{s1} et α_{s2} ovines, Gaye & al (1977) ont établi par différence la séquence de l'extra-pièce de la caséine α_{s2} . Elle est très voisine de celle de la caséine α_{s1} , dont elle ne diffère que par 4 substitutions.

2.1.3. - Caséine β

On connaît la structure primaire de la caséine β bovine depuis 1972 (Ribadeau-Dumas & al, 1972) et sept variants génétiques de cette protéine, A1, A2, A3, B, C, D, E. Les substitutions qui les différencient ont été localisées (Grosclaude & al, 1974). Gordon & al (1972) ont montré que les caséines γ ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$) étaient des fragments de la caséine β correspondant respectivement aux segments C-terminaux 29-209, 106-209 et 108-209*. La même année, Yamauchi et Kaminogawa (1972) montraient que des produits d'hydrolyse de la caséine β par la protéase alcaline du lait et les caséines γ avaient des comportements électrophorétiques identiques.

Cette protéase a été identifiée à la plasmine par Eigel (1977). Eigel & al (1977) ont démontré la formation des 3 caséines γ à partir de la caséine β sous l'action de la plasmine. Les variants génétiques de la caséine γ correspondent à ceux de la caséine β dont ils sont issus (Gordon et al, 1972).

Très récemment, Andrews (1978) a identifié les composants 5 et 8 fast^m des protéoses-peptones comme étant l'un, un mélange de 2 peptides correspondant aux fragments 1-105 et 1-107 de la caséine β , et l'autre, le fragment 1-28. Ces 3 protéoses-peptones sont donc les fragments N-terminaux correspondant aux 3 caséines γ .

La caséine β de buffle a été isolée et analysée par plusieurs auteurs (Nagasawa & al, 1973 ; Abd el-Salam et El-Shibiny, 1975 ; Addeo & al, 1977). Les séquences de ses 22 résidus N-terminaux et de ses 3 résidus C-terminaux, déterminées par ces derniers auteurs, sont identiques aux séquences correspondantes de la caséine β bovine.

Le lait de brebis contient, en proportions analogues, 2 formes de caséines qui ont été isolées et analysées par Richardson et Creamer (1976). Ces protéines ne diffèrent que par leurs teneurs en phosphore (respectivement 5 et 6 atomes/mole). La séquence de la caséine β ovine a été établie récemment par Richardson et Mercier (1978). Cette protéine se distingue de son homologue bovine par 15 substitutions au moins et par la délétion du segment Pro-Tyr. Il est à noter qu'en plus des 15 substitutions mentionnées, 4 autres différences ont été observées par rapport à la séquence de la caséine βA^2 bovine. Il est possible

* La galactothermine, protéine isolée du lait de femme par Shade et Reinhart (1970) est très probablement l'homologue d'une des caséines γ bovines.

que ces 4 différences (vache \rightarrow brebis : Gln \rightarrow Glu, 117 ; Glu \rightarrow Gln, 175 ; Gln \rightarrow Glu, 193 ; Pro-Leu \rightarrow Leu Pro 137-138) soient dues à des erreurs dans la séquence rapportée par Ribadeau-Dumas & al (1972) pour la caséine β A bovine. L'une des 2 formes de la caséine β ovine renferme 5 résidus phosphoséryles homologues des résidus phosphoséryles 15, 17, 18, 19 et 35 de son homologue bovin. L'autre forme possède en plus un groupement phosphate supplémentaire sur le résidu thréonyle 12, qui n'est pas phosphorylé dans la première et qui est remplacé, chez la vache, par un résidu isoleucyle.

La caséine β caprine semble très voisine de son homologue ovine. Ses 2 formes, qui ne diffèrent que d'un groupement phosphate, ont été isolées et analysées (Richardson, 1974 ; Ribadeau-Dumas & al, 1975).

Ont été également isolées et analysées les caséines β de femme (Groves et Gordon, 1970), de chienne (Nagasawa & al, 1972), de lapine (Testud et Ribadeau-Dumas, 1973) et de rate (Pélique, 1978).

La caséine β humaine existe sous plusieurs formes phosphorylées à des degrés divers (de 0 à 5 groupements phosphates par molécule) (Groves et Gordon, 1970). Une séquence partielle de cette protéine a été récemment publiée (Groves et Greenberg, 1977). La chaîne peptidique semble avoir la même longueur que celle de la caséine β bovine. Cependant, comparée à celle-ci, la caséine β humaine présente une déletion de 9 résidus (position 3 à 11) qui semble être compensée par une addition de même longueur localisée dans la région C-terminale de la molécule. L'enchaînement des 28 résidus N-terminaux (qui contiennent tous les groupements phosphates de la molécule) a été établi, ainsi que celui des 4 peptides obtenus par action du bromure de cyanogène et des 4 autres obtenus par action de la trypsine sur la protéine trifluoracétylée. Les groupements phosphates ont été localisés sur les 5 formes phosphorylées de la caséine β humaine. Dans la forme contenant un groupe phosphate, celui-ci est localisé à 50% sur la sérine 18 et 50% sur la sérine 19. La seconde forme phosphorylée l'est complètement sur ces 2 résidus, la 3ème porte un groupe phosphate supplémentaire sur la sérine 17, la 4ème sur la sérine 15 et la 5ème sur la thréonine 12 (Greenberg et Groves, 1978). La séquence 14-21, comportant 4 résidus phosphoséryles, est commune à toutes les caséines β et est homologue à la séquence 63-70 de la caséine α_{s1} bovine.

La structure primaire de l'extra-pièce de la précaséine β ovine a été élucidée par Gaye & al (1977). Elle est très voisine de celle des précaséines α_{s1} et α_{s2} , n'en différant respectivement que par 3 et 3 substitutions.

2.1.4. Caséine κ

Comme on le sait depuis longtemps (voir dans Mc Kenzie, 1971), la caséine κ bovine se trouve dans le lait sous au moins 7 formes différant par leurs teneurs en glucides, dénotées $\kappa 1$ à $\kappa 7$ en allant de la forme la moins glycosylée à la forme la plus glycosylée. Des études déjà anciennes, concernant leur composition en acides aminés et en glucides, leurs extrémités C-terminales, avaient montré que ces formes avaient des chaînes peptidiques identiques et que les glucides constitutifs des fractions $\kappa 2$ à $\kappa 7$ (la fraction $\kappa 1$ en étant dépourvue) étaient essentiellement du galactose, de la N-acétyl galactosamine et de l'acide N-acétyl-neuraminique. Toutes les fractions sont sensibles à la chymosine (EC.3.4.23.4) et stabilisent les autres caséines vis à vis du calcium en formant des micelles. La mise en évidence de la seule liaison peptidique Phe-Met dont la rupture sous l'action de la chymosine produit la coagulation du lait résulte de l'étude des extrémités N- et C-terminales des 2 fragments libérés,

et finalement de l'isolement du peptide trypsine contenant intacte cette liaison (Jollès & al, 1968). La partie C-terminale libérée, soluble, et représentant environ 1/3 de la molécule est appelée caséinomacropéptide (CMP) ou caséinoglycopeptide, tandis que la partie N-terminale, insoluble, constitue la para-caséine κ .

La structure primaire complète de la fraction κ 1 (variant B) a été établie en 1972 (Mercier & al, 1972 ; Brignon & al, 1972 ; Mercier & al, 1973). La molécule est formée de 169 résidus d'acides aminés, dont 2 résidus cystéyles et 1 résidu phosphoséryle, situés respectivement dans la paracaséine κ et dans le CMP. On savait déjà que, dans les fractions glycosylées, tous les glucides étaient localisés dans le CMP.

Il a été montré récemment (Vreeman & al, 1977) qu'une des fractions de la caséine κ bovine contenait 2 groupements phosphates localisés dans le CMP.

Selon Fournet & al (1975) une seule chaîne polysaccharidique serait fixée aux différentes fractions glycosylées, par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique avec probablement la thréonine 131. Cette chaîne pourrait être plus ou moins longue, plus ou moins branchée, renfermant notamment un nombre plus ou moins élevé de résidus N-acétyl neuraminyles. La structure élémentaire de la chaîne serait :



L'acide N-acétyl neuraminique serait lié au galactose et / ou à la N-acétylgalactosamine. La fraction glycosidique de la caséine κ de colostrum serait beaucoup plus complexe, contenant un résidu N-acétylglucosaminyle supplémentaire et davantage de galactose et d'acide N-acétylneuraminique.

Deux variants seulement de la caséine κ bovine, A et B, sont connus. Les 2 sont très répandus. Le variant B diffère du variant A par 2 substitutions, Ile \rightarrow Thr 136 et Ala \rightarrow Asp 148 (Grosclaude & al, 1972).

La caséine κ de buffle a été étudiée en détail par Addeo & al (1977 a, 1977b) et Addeo et Mercier (1977). Elle a été préparée par chromatographie sur hydroxyapatite. Sept composants en ont été isolés par chromatographie sur DEAE-cellulose (Addeo & al, 1977 a). Toutes ces fractions sont sensibles à l'action de la chymosine, ont des compositions en acides aminés identiques. La fraction 1 n'est pas glycosylée. Les autres contiennent, en quantités variables, les mêmes glucides que la caséine κ bovine. La séquence complète du CMP de buffle est connue (Addeo et Mercier, 1977). Elle diffère de celle du CMP bovin par 10 substitutions.

La caséine κ ovine a été isolée et étudiée par Soulier & al (1975). Elle est constituée d'au moins 4 fractions différant par leurs teneurs en glucides (galactose, N-acétyl galactosamine, acides N-acétyl et N-glycoyl neuraminiques). Toutes ces fractions ont des chaînes peptidiques identiques et contiennent 3 résidus cystéyles et 2 groupements phosphates.

La séquence complète de la chaîne peptique de la caséine κ ovine a été établie par Jollès & al (1974). L'addition d'un peptide Val-His a été observée entre les résidus 131 et 132 de la caséine κ bovine. Outre cette différence les caséines κ des 2 espèces diffèrent par 26 substitutions, dont seulement 10 situées dans la para-caséine κ . Bien que non localisés par les auteurs (Jollès & al, 1974) les 2 groupements phosphates sont très certainement situés, comme chez la chèvre, en position 149 et 166.

La caséine K caprine a été isolée, sous forme d'un seul composant par Zittle et Custer (1966), Richardson & al, (1973) et, sous forme de plusieurs composants, par Addeo & al (1978). Elle est constituée d'au moins 5 fractions, de chaînes peptidiques identiques et ne différant que par leurs teneurs en glucides (galactose, galactosamine, acides N-acetyl et N-glycolylneuraminique). Sa chaîne peptidique est très voisine de celle de la caséine K ovine, contenant notamment 3 cystéines, l'addition du dipeptide Val-His, et 2 groupes phosphates. La séquence complète du CMP caprin a été élucidée par Mercier & al (1976). Elle ne diffère de celle du CMP ovin que par 4 substitutions. La sérine 166 est phosphorylée.

Une fraction correspondant à la caséine K a été isolée des caséines entières de truie et de femme, et la séquence des CMPs qui en ont été préparés complètement élucidée (Chobert & al, 1976). Le CMP porcin est plus long que son homologue bovin, une addition de 6 résidus se trouvant insérée entre les résidus 142 et 143 de la caséine K bovine. Comparés au CMP bovin les CMPs porcin et humain présentent de nombreuses substitutions. Ils s'en distinguent notamment par un résidu isoleucyle en position N-terminale (Met chez les autres espèces) et par une hydrophobicité nettement plus élevée de la chaîne peptidique. Leur teneur en glucides est beaucoup plus importante que celle des autres CMP.

Les CMPs de 7 espèces différentes ont été comparés (Mercier & al, 1976). Il apparaît que l'évolution phylogénique de ce fragment a été très rapide, voisine de celle des fibrino-peptides. Cependant la structure primaire des 20 résidus qui entourent la liaison peptidique rompue par la chymosine a été conservée au cours de l'évolution.

La cristallisation de la caséine K a été rapportée par Oeda (1976).

L'extra-pièce de la pré-caséine K ovine a été étudiée par Gaye & al (1977). Elle diffère sensiblement de celle des 3 autres caséines, étant notamment plus longue (21 résidus au lieu de 15), mais possède les mêmes caractéristiques (Met N-terminale, richesse en Leu, forte hydrophobicité).

2.1.5. - Phosphorylation des caséines

L'étude de la structure primaire des caséines, a montré que, dans tous les cas, la phosphorylation se produisait sur les résidus séryles, et, plus rarement, sur des résidus thréonyles. Seuls les résidus hydroxylés impliqués dans une "séquence code" { Ser-X-A, où A est un acide aminé acide (Glu, SerP, Asp), Thr } peuvent être phosphorylés. Cependant certains résidus hydroxylés (dans la caséine K, dans les caséines phosphorylées à différents degrés etc...) se trouvant dans une séquence code ne sont pas toujours phosphorylés. Un seul cas a été observé dans lequel la phosphorylation a lieu par suite de la présence d'un résidu aspartyle en A (caséine α_{so}).

Cette règle de phosphorylation a été amplement démontrée par comparaison de caséines de différentes espèces et de variants génétiques d'une même espèce (Fig.5). Ainsi, par exemple, la substitution Lys \rightarrow Glu 37 qui différencie les variants C et B de la caséine β , entraîne, dans le variant C, la phosphorylation de la sérine 35. De même la substitution Ala \rightarrow Thr 53 qui différencie les variants B et D de la caséine α_{s1} entraîne la phosphorylation de cette thréonine par suite de la position d'un résidu glutamyle en position 55. Lorsque l'on compare les caséines K de chèvre et de vache, on voit que la substitution Glu \rightarrow Ala 168, entraîne, dans la caséine K caprine la phosphorylation du résidu Ser 166. De nombreux autres exemples pourraient être donnés.

Caséine α_{s1}

Caséine β

- 64 -SerP-Ile-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-
- 46 -SerP-Glu-SerP-Thr-Glu-
- 75 -SerP-Val-Glu
- 115 -SerP-Ala-Glu
- 53 - ThrP-Met-Glu- (variant D)
- Ala-Met-Glu-
- 41 SerP-Lys-Asp- (caséine α_{s0})

- SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-
- SerP-Leu-SerP-Lys-SerP-Glu-Glu (β D)
- 35 - SerP-Glu-Glu
- Ser-Glu-Lys- (variant C)
- SerP-Lys-Glu- (variant E)
- 15 - SerP-Leu-SerP-SerP-Glu-Glu- (H)
- 12 - ThrP-Ile-Glu- (H)
- 15 - SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu (H)
- 12 - ThrP-Val-Glu- (O)

Caséine α_{s2}

Caséine κ

- 8 - SerP-SerP-SerP-Glu-Glu
- 56 - SerP-SerP-SerP-Glu-Glu
- 129 - SerP-ThrP-SerP-Glu-Glu
- 3 - ThrP-Met-Glu
- 16 - SerP-Gln-Glu-
- 61 - SerP-Ala-Glu-
- 143 - SerP-Thr-Glu-

- 149 - SerP-Pro-Glu
- 127 - SerP-Gly-Glu- (1)
- 166 - SerP-Thr-Glu (C)
- Ser-Thr-Ala

Figure 5. SITES PHOSPHORYLES DES CASEINES

Dans tous les cas, on trouve la séquence : Ser - X-A A = Glu, SerP, Asp
 Thr - X-A X = acide aminé quelconque

H : protéine humaine ; O : Protéine ovine ; C : protéine caprine. Sans indication :
 protéine
 bovine

(1) Mercier & al, résultat non publié. 2ème site de phosphorylation de la fraction de caséine κ bovine isolée par Vreeman & al (1977).

Les travaux de Bingham & al (1977) et Mc Kinlay & al (1977) ont montré que la phosphorylation des caséines avait lieu dans l'appareil de Golgi, sous l'action d'au moins une protéine kinase indépendante de l'AMP cyclique et pour l'activité de laquelle un cation divalent est essentiel. L'étude de l'action de cette kinase sur divers substrats a confirmé l'exigence, pour cet enzyme, de la séquence code observée chez les caséines.

Les caséines sont en général de bons substrats pour les protéines-kinases. Cependant, à l'exception de kinases de la glande mammaire, les kinases n'ont pas en général la spécificité de celles-ci. Certaines protéines kinases dépendant de l'AMP cyclique qui phosphorylent notamment les histones suivant une séquence c o d e B - X₁ ou X₂ - Ser, où B est un résidu basique, Arg ou Lys, sont capables de phosphoryler spécifiquement la caséine β -B sur la sérine 124 par suite du remplacement de Ser 123 (variant A) par Arg dans le variant B (Kemp & al, 1975).

2.2. - Protéines du lactosérum

Parmi ces protéines, certaines sont synthétisées par la glande mammaire (α -lactalbumine, β -lactoglobuline, lactoferrine, lactoperoxydase, certaines immunoglobulines), d'autres proviennent du sang (sérum albumine, lysozyme etc.). Nous nous intéresseront ici exclusivement aux travaux récents relatifs aux protéines synthétisées par la glande mammaire. Le lecteur pourra se référer à la revue de Patton & Keenan (1975) en ce qui concerne les protéines de la membrane des globules gras.

2.2.1. - α -lactalbumine

L' α -lactalbumine est une protéine que l'on trouve dans les laits de toutes les espèces qui produisent du lactose. Sa fonction biologique en tant que constituant de la lactose synthétase a été décrite par Ebner & al (1966). Une revue ayant trait à la lactose synthétase a été publiée en 1975 (Hill et Brew, 1975). Les séquences complètes de l' α -lactalbumine bovine (Brew & al, 1973), de cobaye (Brew, 1972) et humaine (Findlay et Brew, 1972) sont connues, ainsi qu'une séquence partielle de celle de kangourou (Brew & al, 1973) et de celle de buffle (Addeo & al, 1976). L' α -lactalbumine a été isolée des laits de chèvre, de brebis et de truie (Schmidt & Ebner, 1972).

Les α -lactalbumines des différents espèces ne contiennent pas en général de glucides. On sait cependant que plusieurs formes mineures de l' α -lactalbumine bovine contiennent des glucides (Barman, 1970 ; Hopper et Mc Kenzie, 1973).

L' α -lactalbumine de rate a été récemment isolée et analysée. C'est une glycoprotéine existant sous au moins 3 formes glycosylées, qui semblent différer par leurs teneurs en acide sialique. Les 3 formes ont une activité lactose synthétase (Brown & al, 1977).

Un nombre important d'études ont été consacrées à l'activité biologique de l' α -lactalbumine et à sa structure tertiaire souvent comparée à celle du lysozyme, ces deux protéines dérivant vraisemblablement d'un ancêtre commun au vu des homologies qui existent entre leurs structures primaires (Brew et al, 1970).

Si un seul variant génétique, B, de l' α -lactalbumine a été trouvé chez les bovins, un variant rare, A, a été détecté chez le zébu. Il diffère du variant B par une substitution Gln(A) \rightarrow Arg(B) en position 10 (Bell & al, 1970).

Le précurseur de l' α -lactalbumine ovine comporte une extra-pièce de 19 résidus (Mercier & al, 1978b).

2.2.2. - β -Lactoglobuline

La β -lactoglobuline est la protéine dominante du lactosérum de vache. Elle n'existe cependant pas dans toutes les espèces. On sait notamment qu'elle n'existe pas chez la femme, le cobaye et la chamelle. Cependant, on sait maintenant qu'elle n'est pas propre aux ruminants comme on le pensait autrefois. Elle a été en effet isolée des laits de truie (Kessler et Brew, 1970), de jument (Jenness, 1978) et d'ânesse (Addea, 1978, communication personnelle).

La structure primaire complète de la β -lactoglobuline bovine est connue (Braunitzer & al, 1972). Six variants génétiques, A, B, C, D, D_{yak} et D_{yak}⁴, sont connus ainsi que les substitutions d'acides aminés qui différencient les 4 premiers (Grosclaude & al, 1974). Le variant D_r semble avoir la même composition que le variant A, mais possède une copule glucidique (Bell & al, 1970). Le variant D_{yak} est différent des variants D et D_r et n'a été trouvé que chez le yak.

La β -lactoglobuline de buffle a été isolée et caractérisée par la séquence de 19 résidus N-terminaux et 2 résidus C-terminaux. Elle semble ne différer de la β -lactoglobuline B humaine que par 3 substitutions (Addea & al, 1976).

Les β -lactoglobulines caprine et ovine ont été isolées depuis longtemps. On connaît 2 variants A et B de la β -lactoglobuline ovine. La β -lactoglobuline de truie ne possède pas de groupement SH libre comme son homologue bovin. On en connaît 2 variants génétiques, A et B (voir dans Mc Kenzie, 1971).

Le précurseur de la β -lactoglobuline ovine comporte une extra-pièce de 19 résidus (Mercier & al, 1978a).

2.2.3. Lactoferrine

Une revue très complète concernant la lactoferrine a été publiée par Masson (1970). Cette protéine a été identifiée dans les laits de femme, de vache, de chèvre, de truie, de jument et de souris. Elle semble absente des laits de rate, de lapine et de chienne (Masson et Hereman, 1971).

La lactoferrine bovine a été initialement isolée et étudiée par Groves (1960) sous le nom de "protéine rouge". C'est une glycoprotéine de masse moléculaire 76.000 environ, composée d'une seule chaîne peptidique et pouvant fixer réversiblement 2 atomes de Fe⁺⁺⁺ par mole. Elle est présente dans le lait sous plusieurs formes ayant des compositions en acides aminés voisines, mais des teneurs en glucides (mannose, galactose, fucose, glucosamine, galactosamine et acide N-acétylneuraminique) différentes. La proportion totale de glucides est de l'ordre de 10%, dont près du quart constitué par du mannose (Chéron & al, 1977).

La lactoferrine humaine, très abondante dans le lait de femme, a été beaucoup plus étudiée. Elle est très voisine de son homologue bovine. Comme celle-ci probablement, elle est constituée d'une chaîne peptidique présentant 2 régions homologues portant chacune un des sites de fixation du fer. Cependant ces 2 sites ne sont pas équivalents. La fixation du fer fait intervenir l'ion

bicarbonate et des résidus tyrosyles et histidyles (Masson, 1970). La séquence N-terminale de 24 résidus a été établie. Elle est manifestement homologue de celle de la transferrine sérique et de l'ovotransferrine (conalbumine). Ces 3 protéines qui ont des propriétés voisines ont très vraisemblablement une origine phylogénique commune (Jollès & al, 1976). La structure des 2 unités polysaccharidiques qui sont liées à la lactoferrine humaine par des liaisons Asn-N-Acetyl-glucosamine a été élucidée (Spik & al, 1974).

Des renseignements plus complets concernant la lactoferrine humaine seront trouvés dans la revue de Bezkerovainy (1977) ayant trait aux protéines du lait de femme. Le rôle biologique de la lactoferrine sera discuté plus loin.

2.2.4. - Lactoperoxydase

Comme la lactoferrine, que l'on trouve dans les sécrétions externes et dans les leucocytes neutrophiles (Masson, 1970), la lactoperoxydase n'est pas un constituant exclusif du lait. Elle a été détectée dans les glandes salivaires et lacrymales des bovins (Morrison et Allen, 1966).

La lactoperoxydase a été isolée des laits de vache, de brebis, de chèvre et de femme. C'est une glycoprotéine de masse moléculaire voisine de 77.000, peut-être formée de 2 sous-unités, et comportant un groupement prosthétique hémique lié à la protéine par liaisons esters ou amides (in Mc Kenzie, 1971).

2.2.5. - Autres protéines du lait

a) Enzymes

Les enzymes du lait ont été passés en revue par Shahani (1966), et Groves (in Mc Kenzie, 1971). Nous ne parlerons que de deux d'entre eux.

- Le lysozyme est un constituant des laits et des fluides biologiques. Si son activité a été détectée dans le lait de nombreuses espèces, il ne semble avoir été isolé que des laits de femme, de babouin et de vache.

La structure primaire complète du lysozyme de lait humain a été établie par Jollès et Jollès (1971), et celle du lait de babouin par Herman et Jollès (1973). La structure du lysozyme de lait de vache a été étudiée par Eitenmiller & al (1976).

Comme nous l'avons vu, le lysosyme, dont l'activité biologique sera discutée plus loin, et l' α -lactalbumine ont une origine commune. Ceci a conduit Hopper et Mc Kenzie (1974) à étudier ces 2 protéines dans le lait des monotrèmes (ornithorhynque et échidné). L'un des lysosymes d'échidné, en présence de protéine A bovine, aurait une activité lactose synthétase.

- La protéase alcaline du lait, connue depuis longtemps, a été identifiée à la plasmine par Eigel (1977a). Dans le sang, cet enzyme, qui a une spécificité voisine de celle de la trypsine, est présent sous forme de plasminogène. La plasmine, produite sous l'action de l'urokinase, est responsable de la destruction de la fibrine lorsque se forme un caillot. Comme nous l'avons vu, la plasmine hydrolyse dans le lait la caséine β en produisant les caséines γ et certaines protéases-peptones. La plasmine serait liée aux micelles de caséine à température ordinaire et s'en détacherait à basse température ainsi que la caséine β en produisant une protéolyse plus intense de celle-ci (Reimerdes et Herlits, 1978).

b) Immunoglobulines et protéines apparentées

- Une protéine présente en faible quantité dans le lait de vache avait été isolée à l'état cristallisé, et nommée lactolline, par Groves & al (1963). Sa composition en acides aminés et sa masse moléculaire, 43.000, avaient été déterminées. La lactolline a été récemment identifiée à la β_2 -microglobuline. La β_2 -microglobuline humaine est une protéine de masse moléculaire 11.800, présente dans différents fluides du corps et à la surface de certaines cellules. Sa séquence a été établie et son homologie avec la région constante des chaînes légères ou lourdes des IgG, démontrée. La β_2 -microglobuline est également identique à un petit peptide lié à l'antigène d'histocompatibilité HL-A. La lactolline est constituée de 4 unités identiques, de masse moléculaire 12.000, unies par des liaisons covalentes. L'établissement de la séquence des 32 résidus N-terminaux a démontré que la lactolline était la β_2 -microglobuline bovine (Groves et Greenberg, 1977).

- Le lait de vache, et surtout le colostrum, contient des IgG, des IgA et IgM, les plus abondantes étant les IgG. Les IgG et les IgA, chez les bovins, peuvent traverser la barrière intestinale et confèrent au jeune l'immunité. A l'inverse, les IgA, qui sont les immunoglobulines prédominantes du lait humain, ne peuvent traverser la barrière intestinale du jeune. Les IgG et les IgM du lait sont apparemment identiques à leurs homologues sériques. Par contre les IgA du lait possèdent une structure particulière et sont appelées IgA sécrétoires (sIgA). Les sIgA, de masse moléculaire 420 000 se composent d'un dimère IgA (de masse moléculaire 330.000) associé à une "pièce sécrétoire" (protéine de masse moléculaire 78.000). et à une "j-chain" (joining chain) de masse moléculaire 15.000. La pièce sécrétoire est fixée au dimère IgA par liaisons disulfures et pourrait servir à protéger l'IgA contre les protéases. La "J-chain" aurait pour fonction d'unir entre elles les molécules d'immuno-globulines (Bezkarovainy, 1977). Une revue concernant les Ig du lait a été publiée par Butler (1974).

Nous terminerons là cette revue des protéines du lait, dans lequel bien d'autres protéines ont été identifiées (Mc Kenzie, 1971 ; Bezkarovainy, 1977).

3. DEVENIR DES PROTEINES DU LAIT

Nous évoquerons dans ce chapitre aussi bien la destinée naturelle des protéines du lait que leur devenir en technologie.

3.1. - Rôle biologique des protéines du lait

A sa naissance, le jeune mammifère doit recevoir, par l'intermédiaire du lait, tous les éléments dont il a besoin pour sa survie et son développement. Les protéines jouent ici un rôle de premier plan, d'une part par leurs produits de dégradation sous l'effet des enzymes digestifs, d'autre part, par le rôle spécifique que certaines d'entre elles peuvent jouer au niveau intestinal ou chez la mère. On pense en effet que, chez l'homme tout au moins, les protéines, sont digérées lentement dans l'estomac et passent pour beaucoup d'entre elles pratiquement intactes dans l'intestin (Bullen & al, 1974).

3.1.1. - Rôle dans l'apport d'azote

Pratiquement tout l'azote nécessaire au jeune pour la biosynthèse de ses protéines et de ses acides nucléiques provient des protéines. L'azote apporté par le lait doit répondre quantitativement et qualitativement à ses besoins.

3.1.2. - Rôle dans l'apport d'acides aminés essentiels

Tous les acides aminés apportés au jeune ne lui sont pas indispensables: certains peuvent être synthétisés par son organisme à partir d'autres acides aminés, de glucides ou de lipides. Cependant d'autres acides aminés, qu'il ne peut synthétiser, doivent lui être apportés par les protéines du lait. Ce sont les acides aminés essentiels : Thréonine, méthionine (cystéine), valine, iso-leucine, leucine, lysine, arginine, histidine, phénylalanine (tyrosine), tryptophane. La cystéine et la tyrosine, dont les précurseurs sont respectivement la méthionine et la phénylalanine, sont considérés comme semi-indispensables, car leur apport diminue les besoins en Met et Phe.

La nature a particulièrement bien adapté la structure tertiaire, très lâche, des caséines, dont la plupart des liaisons sont accessibles aux protéases digestives, à ce rôle d'apport d'acides aminés. Cependant les protéines du lactosérum, très compactes, attaquées plus difficilement par les protéases, complètent fort heureusement les caséines qui sont déficientes en certains acides aminés (Met, Trp).

3.1.3. - Rôle de transport

Un certain nombre de protéines du lait ont, de toute évidence, un rôle de transport, de minéraux notamment, depuis la mamelle jusqu'aux sites d'utilisation.

- Mention spéciale doit être faite ici des caséines. Celles-ci se trouvent dans le lait sous forme de micelles, riches en minéraux, d'un diamètre moyen de 100 nm, elles mêmes constituées de sous unités sphériques (sub-micelles), d'un diamètre moyen de 10 nm, entourées d'ions inorganiques (Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , citrate³⁻) (Schmidt, 1978). La forme exacte dans laquelle se trouve ces "ions" au sein de la micelle n'est pas connue : une partie doit être sous forme d'ions liés par liaisons ioniques, une autre sous forme de sels (phosphates, citrates) non dissociés. Il est néanmoins certain que les groupements phosphates des caséines ont une forte affinité pour le calcium et le magnésium.

La stabilité micellaire est assurée par la caséine κ . On sait que la chymosine ou la pepsine stomacales déstabilisent les micelles par hydrolyse spécifique de cette caséine. Cependant le coagulum qui se forme retient tous les ions minéraux qui étaient fixés aux micelles. Seul un abaissement du pH peut les libérer, ce qui n'est peut être pas le cas dans l'estomac du nouveau-né dont le pH est relativement élevé.

Quelle que soit sa destinée dans l'estomac, le système micellaire permet de maintenir sous forme "liquide" des quantités de phosphate et de calcium qui ne seraient pas solubles en l'absence des caséines.

- La lactoferrine a certainement un rôle dans le transport du fer. Cette protéine, qui a une forte affinité pour le fer, fixe dans le lait la quasi totalité de ce cation pour le transférer vraisemblablement à des sites spécifiques de la muqueuse intestinale.

- D'autres protéines du lait, qui fixent le folate, la vitamine B_{12} , les corticostéroïdes ont certainement une signification biologique (Bezkorovainy, 1977).

3.1.4. - Rôle spécifique chez la mère

Certaines protéines du lait peuvent avoir un rôle spécifique dans l'organisme maternel. C'est le cas de l' α -lactalbumine, composant-clé du dernier enzyme intervenant dans la biosynthèse du lactose. Cet enzyme est formé de 2 constituants, la protéine A ou UDP-galactosyltransférase, et la protéine B qui est l' α -lactalbumine. En absence de protéine B (chez un animal qui n'est pas en lactation), la protéine A a une activité N-acétyllactosamine-synthétase et interviendrait dans la biosynthèse d'oligosaccharides et de glycoprotéines (Brodbeck & al, 1967).

La protéine A est en grande partie fixée aux membranes du Golgi des cellules sécrétrices mammaires. On la trouve également dans le lait. Elle a été isolée du lait de femme sous 3 formes de masses moléculaires différentes, qui dérivent les unes des autres par une protéolyse limitée (Prieels & al, 1975).

3.1.5. - Rôle dans l'établissement de la flore digestive et dans l'immunité du jeune

- Aux oligosaccharides et à certaines glycoprotéines du lait de femme est attribué un rôle important dans l'établissement d'une flore à *Lactobacillus bifidus* dans l'intestin du nouveau-né (Bezkorovainy, 1977).

- L'action lytique du lysozyme sur un grand nombre d'espèces bactériennes est bien connue. Cette enzyme hydrolyse les chaînes (-Acide N-acétyl muraminique - N-acétyl-glucosamine) qui constituent l'ossature de la muréine des parois bactériennes. Bien que résistant à la digestion, son action lytique dans l'intestin a été mise en question. Sa fonction principale y serait peut-être plutôt en rapport avec le métabolisme de glycoprotéines (Kuettner & al, 1974). L'enrichissement du lait de vache en lysozyme de blanc d'oeuf de poule pour l'alimentation des nourrissons semble sans effet sur la flore du tractus digestif. Il faut cependant noter que le lysozyme isolé du lait est beaucoup plus actif que le lysozyme de blanc d'oeuf et est actif *in vitro* sur beaucoup de bactéries Gram + et Gram- qui sont totalement résistantes au lysozyme de blanc d'oeuf. De plus, le lait de femme contient environ 3.000 fois plus de lysozyme que le lait de vache (Reiter, 1978).

- La lactoferrine, lorsqu'elle n'est pas saturée en fer comme c'est le cas dans le lait, a un effet bactériostatique *in vitro* en présence de bicarbonate par suite de son fort pouvoir chélateur qui prive la bactérie du fer dont elle a besoin pour croître. Cependant, bien que le colostrum soit riche en lactoferrine, il n'a pas cet effet inhibiteur *in vitro* s'il n'est pas supplémenté en bicarbonate. Il a été montré que cette anomalie est due à la teneur élevée en citrate du colostrum, citrate qui complexe le fer de la lactoferrine et le rend utilisable par les bactéries. Cependant des travaux récents indiquent que le citrate est rapidement absorbé *in vivo* dans l'intestin du veau. Le bicarbonate sécrété par le pancréas devient alors prépondérant, ce qui favoriserait l'action de la lactoferrine. Il faut signaler que, si la lactoferrine perd rapidement son fer à des pH inférieurs à 4,5 (ce qui n'est peut-être pas le cas dans l'estomac du nouveau-né), elle est très stable aux protéases digestives lorsqu'elle est chargée en fer (Reiter, 1978) et que le lait humain est 100 fois plus riche en lactoferrine que le lait de vache.

- On sait depuis longtemps que le système lactoperoxydase/Thiocyanate/peroxyde d'hydrogène (système LP) du lait inhibe temporairement ou tue certaines bactéries. Le lait de vache est riche en lactoperoxydase synthétisée par la glande mammaire, contient l'ion SCN^- provenant notamment des végétaux ingérés par l'animal. Le peroxyde d'hydrogène est produit par les lactobacilles qui font partie de la flore naturelle du lait. Ceux-ci, comme la lactoperoxydase, résistent bien au bas pH de l'estomac.

Le mécanisme d'action du système LP est connu : la lactoperoxydase se combine au peroxyde d'hydrogène pour oxyder l'ion SCN^- . Le produit d'oxydation est responsable de l'inhibition (Reiter, 1978).

- Il est maintenant généralement accepté qu'une production locale d'anticorps a lieu à la fois dans la glande mammaire et dans l'intestin et que ces anticorps jouent un rôle dans la défense contre les infections entériques. On connaît mieux les voies par lesquelles la glande mammaire reçoit l'information qui lui fait produire tel ou tel anticorps spécifique. On a par exemple montré récemment que des *E. coli* d'un sérotype rare ingérés par des femmes dans le dernier mois de grossesse entraînaient le transport sélectif de lymphocytes producteurs de s-IgA vers la glande mammaire et la synthèse d'anticorps spécifiques. Il semble également qu'une infection de la mamelle produite par la tétée d'un veau lui-même infecté stimule la production mammaire d'anticorps spécifiques. Les anticorps du lait peuvent aussi provenir de la réponse antigénique à des anticorps naturels tels que les microorganismes du rumen.

Si les IgA sont considérés comme des agents protecteurs de la muqueuse intestinale, il semble que les IgG1 et les IgM du colostrum ou du lait soient bactéricides en présence de complément s'il n'y a pas d'effet prozone. Cependant, tous les composants du complément ne semblent pas présents dans le colostrum ou le lait, et la résistance du complément à l'acidité de l'estomac et aux enzymes digestifs apparaît faible (Reiter, 1978).

3.1.6. - Rôle possible des caséines

Si l'un des rôles évidents des caséines est la fourniture au jeune d'azote et d'acides aminés, de possibles fonctions physiologiques de fragments de ces protéines ont été postulées ou démontrées.

- Garnot & al (1977) ont montré que la caséine entière stimulait la sécrétion de chymosine chez le jeune veau. Il est tentant de penser qu'un des premiers peptides libérés dans l'estomac, par exemple le CMP, pourrait être responsable de cette action par une voie de type hormonal.

- Dans une série d'articles (voir notamment Chernikov, 1974), dont l'un présenté à ce Congrès, des auteurs russes ont montré que le CMP (ou un fragment de celui-ci) était capable de traverser la barrière intestinale pour jouer un rôle analogue à celui de la secrétine et inhiber l'action de la gastrine. Ces effets abaisseraient l'acidité de l'estomac et élèveraient le pH dans l'intestin, favorisant l'action de la chymosine aux dépens de celle de la pepsine. Tout ceci préviendrait la destruction des protéines de transport et de protection du colostrum chez le nouveau-né.

Si un tel effet était général, on pourrait l'attribuer à la partie N-terminale du CMP dont nous avons vu la constance dans toutes les espèces étudiées.

- Après d'autres, des auteurs japonais, sur la base d'étude *in vivo*, ont postulé un rôle à des fragments phosphorylés provenant des caséines dans le transport

intestinal du calcium vers des sites d'absorption spécifiques (Naito et Susuki, 1974). Ces fragments seraient vraisemblablement ceux dont l'étude de la séquence de caséines de diverses espèces nous ont montré la constance. Contenant 4 résidus phosphoséryles, ces peptides ont une forte affinité pour le calcium tout en restant solubles ; ils sont très résistants aux protéases et se retrouvent, intacts dans le tiers distal de l'intestin.

3.2. - Devenir des protéines du lait en technologie

Nous n'étudierons pas ici les différentes utilisations des protéines du lait, qui sont bien connues de tous, mais plutôt les modifications que subissent ces protéines lors de divers traitements technologiques. Citons cependant l'intérêt grandissant pour de nouvelles utilisations des protéines du lait comme agents moussants, émulsifiants ou gélifiants.

Deux facteurs essentiels peuvent modifier les protéines du lait en technologie : la température et les protéases.

3.2.1. - Action du froid sur les protéines du lait

En ce qui concerne les protéines, l'influence du stockage du lait réfrigéré est bien connue. En l'absence de toute action enzymatique le froid ne peut affecter que les interactions non covalentes qui contribuent à maintenir les structures tertiaire et quaternaire des protéines.

On sait depuis longtemps que le stockage au froid a pour effet essentiel un passage important de la caséine β dans le lactosérum, associé à une modification des équilibres minéraux. Ces phénomènes conduisent à un allongement du temps de coagulation et à la formation de caillés de structure peu compacte. Reimerdes & al (1977) ont montré que ces défauts peuvent être corrigés par un chauffage à 60-65°C pendant 20 à 30 min., ce qui de surcroît constitue une pasteurisation basse.

Comme nous l'avons vu, la conservation du lait au froid entraîne également la libération de la plasmine fixée aux micelles de caséine et une action accrue de cette protéase sur la caséine β elle-même libérée (Reimerdes et Herlitz, 1978).

3.2.2. - Action de la chaleur sur les protéines du lait

On sait que les températures élevées dénaturent les protéines. Les caséines, qui sont en quelque sorte "naturellement dénaturées", sont peu sensibles à l'action de la chaleur, à l'encontre des protéines du lactosérum. L'action de la chaleur sur les 2 principales protéines du lactosérum, α -lactalbumine et β -lactoglobuline, est bien connue. Elle entraîne la dénaturation de ces protéines et des interactions entre elles et avec la caséine κ présente dans les micelles, notamment par l'intermédiaire de ponts disulfures. Les immunoglobulines, la lactoferrine sont particulièrement sensibles aux températures élevées.

L'action de la chaleur sur les caséines a été étudiée en détail par Lorient & al (1977). Aux températures élevées un certain nombre de liaisons peptidiques et de liaisons esters sont coupées. Les liaisons les plus sensibles semblent être les liaisons esters de la sérine avec les groupements phosphates. La déshydroalanine qui se forme est fortement réactive et interagit avec les groupements NH_2 de la lysine pour donner la lysinoalanine, et avec la cystéine pour donner la lanthionine. Un nombre important de peptides différents sont libérés, qui ne représentent cependant dans leur ensemble qu'une proportion très faible de la caséine.

La formation de lysinoalanine, composé toxique, se forme de préférence à pH alcalin. Son dosage permet d'apprécier les traitements qu'ont subi les caséinates industriels (Creamer et Matheson 1977).

Le chauffage du lait aux températures de stérilisation et même de pasteurisation conduit également à des interactions entre la lysine et le lactose (réaction de Maillard). Ces effets ont été étudiés récemment en détail par Möller & al (1977). Ces auteurs ont notamment identifié la lactulose-lysine et la fructose-lysine, dérivés de cette réaction qui diminuent la lysine utilisable par l'organisme. Il semble qu'une des meilleures méthodes permettant d'estimer l'état de la lysine dans un produit laitier chauffé soit le dosage de l'homoarginine après réaction avec l'O-méthylisourée.

Les traitements thermiques affectent aussi les acides aminés soufrés (Met, Cys) avec formation notamment de composés soufrés volatils. Un traitement UHT peut entraîner une perte de 34% de la méthionine aussi bien que de la cystéine (Aboshama et Hansen, 1977).

3.2.3. - Action des protéases sur les protéines du lait

Les protéases provenant du lait ou de microorganismes n'ont en général qu'une action limitée dans le lait liquide. Par contre, ces enzymes jouent un rôle prépondérant dans la coagulation du lait et dans la maturation du fromage. Les rôles respectifs de l'agent coagulant et des microorganismes dans la maturation ont été clairement démontrés ces dernières années par l'utilisation de caillés aseptiques (Desmazeaud et Gripon, 1977).

- Rôle de l'agent coagulant

Les enzymes coagulants ont fait l'objet d'une étude très détaillée de Green (1977). Suivant leur origine, ces enzymes ont une influence plus ou moins marquée sur le rendement fromager, la texture et la flaveur du fromage affiné. Ils sont souvent responsables de l'amertume du fromage : leur action libère des caséines essentiellement des peptides, dont certains, de taille relativement faible et très hydrophobes, présentent une saveur amère.

- Rôle des protéases microbiennes

Si la protéolyse dont sont responsables les moisissures peut être très importante, celle produite par les bactéries est en général très limitée. C'est cependant souvent ces microorganismes qui sont responsables de la production de composés sapides ou aromatiques provenant soit de leur métabolisme, soit de modifications d'acides aminés libres provenant des caséines.

Desmazeaud et Gripon (1977) ont publié une revue traitant du mécanisme général de la dégradation des protéines durant l'affinage du fromage.

4. BIBLIOGRAPHIE

- Aboshama, K. et Hansen, A.P. 1977. Journal of Dairy Science, 60, 1374.
- Adéo, F., Chobert, J.M. et Ribadeau-Dumas, B. 1977a. Journal of Dairy Research, 44, 63.
- Adéo, F., et Mercier, J.C. 1977. Biochimie, 59, 375.

- Addéo, F., Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1976. FEBS Letters, 63, 255.
- Addéo, F., Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1977b. Journal of Dairy Research, 44, 455.
- Addeo, F., Soulier, S., Pélissier, J.P., Chobert, J.M. Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1978. Journal of Dairy Research, 45, 191.
- Andrews, A.T. 1978. HRI/IDF Milk Proteins Symposium, Ayr, Ecosse.
- Annan, W.D. et Manson, W. 1969. Journal of Dairy Research, 36, 259.
- Arave, C.W., Gillett, T.A., Price, D.A. et Mathews, D. 1973. Journal of Animal Science, 36, 241.
- Aschaffenburg, R. 1963. Journal of Dairy Research, 30, 251.
- Schaffenburg, R. et Drewry, J. 1955 Nature, London, 176, 218.
- Barman, T. 1970. Biochimica et Biophysica Acta, 214, 242.
- Bell, K.B., Mc Kenzie, H.A., Murphy, W.H. et Shaw, D.C. 1970. Biochimica et Biophysica Acta, 214, 437.
- Bell, K., Mc Kenzie, H.A., Murphy, W.H. et Shaw, D.C. 1970. Biochimica et Biophysica Acta, 214, 427.
- Bezkoravainy, A., 1977. Journal of Dairy Science, 60, 1023.
- Bingham, E.W. et Farrell, H.M. 1977. Journal of Dairy Science, 60, 1199.
- Bingham, E.W., Farrell, H.M. et Basch, J.J. 1972. Journal of Biological Chemistry 247, 8193.
- Boulanger, A. 1977. Thèse 3ème cycle. Université Paris VII, France.
- Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. et Stangl, A. 1972. Hoppe-Seyler's Zeitung für Physiologie und Chemie, 353, 832.
- Brew, K. 1972. European Journal of Biochemistry, 27, 241.
- Brew, K., Castellino, F.J., Vanaman, T.C. et Hill, R.L. 1970. Journal of Biological Chemistry, 245, 4570.
- Brew, K., Steinman, H.M. et Hill, R.L. 1973. Journal of Biological Chemistry, 248, 4739.
- Brignon, G., Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1972. FEBS Letters, 27,301.
- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B. et Mercier J.C. 1976. FEBS Letters, 71,111.
- Brignon, G., Ribadeau-Dumas, B., Mercier, J.C., Pélissier, J.P. et Das,B.C. 1977, FEBS Letters, 76, 274.
- Brodbeck, U., Denton, W.L., Tanahashi, N. et Ebner, K.E. 1967. Journal of Biological Chemistry, 242, 1391.
- Brown, R.C., Rish, W.W., Hudson, B.G. et Ebner, K.E. 1977. Biochimica et Biophysica Acta, 491, 82.
- Bullen, J.J., Rogers, H.J. et Griffith, E. 1974, in Microbial Iron Metabolism. A comprehensive treatise p. 157. Academic Press, New-York.

- Butler, J.E., in Lactation. 1974. B.L. Larsen et B.R. Smith ed. Vol. III, p. 217, Academic Press, New-York.
- Chernikov, M.P., Nikhlskaya, G.V., Stan, E.Y., Schlygin, G.K. et Vasilevskaya, L.S. 1974. Vop.. Pitania, 2, 21.
- Chéron, A., Mazurier, J. et Fournet, B. 1977. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 284, 585.
- Chobert, J.M., Mercier, J.C., Bahy, C. et Hazé, G. 1976. FEBS Letters, 72, 173.
- Creamer, L.K. et Matheson, A.R. 1977. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 12, 253.
- Desmazeaud, M.J. et Gripon, J.C. 1977. Milchwissenschaft, 32, 731.
- Ebner, K.E., Denton, W.L. et Brodbeck, U. 1966. Biochemical and Biophysical Research Communications, 24, 232.
- Eigel, W.N. 1977. International Journal of Biochemistry, 8, 187.
- Eigel, W.N., Chibber, B.A.K. Tomich, J.M. et Mertz, E.T. 1977. Proceedings of the National Academy of Sciences, soumis pour publication.
- Eitenmiller, R.R., Friend, B.A. et Shabani, K.M. 1976. Journal of Dairy Science, 59, 834.
- Findlay, J.B.C. et Brew, K. 1972. European Journal of Biochemistry, 27, 65.
- Fournet, B., Fiat, A.M., Montreuil, J. et Jollès, P. 1975. Biochimie, 57, 161.
- Garnot, P., Touillec, R., Thapon, J.L., Martin, P., Hoang, M.T. Mathieu, C.M. et Ribadeau-Dumas, B. 1977. Journal of Dairy Research, 44, 9.
- Gaye, P., Gautron, J.P., Mercier, J.C. et Hazé, G. 1977. Biochemical and Biophysical Research Communications, 79, 903.
- Gordon, W.G., Groves, M.L., Greenberg, R., Jones, S.B., Kalan, E.B., Peterson, R.F. et Townend, E. 1972. Journal of Dairy Science, 55, 261.
- Green, M.L. 1977. Journal of Dairy Research, 44, 159.
- Greenberg, R. et Groves, M.L. 1978. HRI/DF Milk Proteins Symposium, Ayr, Ecosse.
- Grosclaude, F. 1974. Thèse Paris VII. France.
- Grosclaude, F., Garnier, J. Ribadeau-Dumas, B. et Jeunet, R. 1964. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris, 259, 1569.
- Grosclaude, F., Jourdrier, J. et Mahé, M.F. 1978. HRI/IDF Milk Proteins Symposium, Ayr, Ecosse.
- Grosclaude, F., Mahé, M.F. Mercier, J.C., Bonnemaire, J. et Teissier, J.H. 1976. Annales de Génétique et de Sélection Animale, 8, 481.
- Grosclaude, F., Mahé, M.F. Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1970. FEBS Letters, 11, 109.
- Grosclaude, F., Mahé, M.F., Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1972a. European Journal of Biochemistry, 26, 328.

- Grosclaude, F., Mahé, M.F., Mercier, J.C. et Ribadeau-Dumas, B. 1972b. *Annales de génétique et de Sélection Animale*, 4, 515.
- Grosclaude, F., Pujolle, J. Ribadeau-Dumas, B. et Garnier, J. 1966. in *Polymorphismes biochimiques des Animaux, Proceedings of the 10 th European Conference on Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism*, I.N.R.A., Paris.
- Groves, M.L. 1960. *Journal of the American Chemical Society*, 82, 3345.
- Groves, M.L., Basch, J.J. et Gordon, W.G. 1963. *Biochemistry*, 2, 814.
- Groves, M.L. et Gordon, W.G. 1970. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 140, 47.
- Groves, M.L. et Greenberg, R. 1977. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77, 320.
- Hermann, J. et Jollès, J. 1973. *Journal of Molecular Biology*, 79, 587.
- Hill, R.L. et Brew, K. 1975. *Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology*, 43, 411.
- Hoagland, P.D., Thompson, M.P. et Kalan, E.B. 1971. *Journal of Dairy Science*, 54, 1103.
- Hopper, K.E. et Mc Kenzie, H.A. 1973. *Biochimica et Biophysica Acta*, 295, 352.
- Hopper, K.E. et Mc Kenzie, H.A. 1974. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 3, 93.
- Jenness, R. 1978. *HRI/IDF Milk Proteins Symposium*, Ayr, Ecosse.
- Jollès, J., Alais, C. et Jollès, P. 1968. *Biochimica et Biophysica Acta*, 168, 591.
- Jollès, J., Fiat, A.M., Schoentgen, F., Alais, C. et Jollès, P. 1974. *Biochimica et Biophysica Acta*, 365, 335.
- Jollès, J. et Jollès, P. 1971. *Helvetica Chimica Acta*, 54, 2668.
- Jollès, J., Mazurier, J. Boutigue, M.H., Spik, G., Montreuil, J. et Jollès, P. 1976. *FEBS Letters*, 69, 27.
- Kemp, B.E., Bylund, D.B., Huang, T.S. et Krebs, E.G. 1975. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 72, 3448.
- Kessler, E. et Brew, K. 1970. *Biochimica et Biophysica Acta*, 200, 449.
- Kiddy, C.A., Johnston, J.O. et Thompson, M.P. 1964. *Journal of Dairy Science*, 47, 147.
- King, J.W.B., Aschaffenburg, R., Kiddy, C.A. et Thompson, M.P. 1965. *Nature*, London, 206, 324.
- Kuettnner, K., Einsenstein, R. et Sorgente, N. 174, in *Lysozyme*, p. 399. E.F. Osseman, R.E. Canfield et S. Beychok, eds. Academic Press, New York.
- Larsen, B. et Thymann, M. 1966. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 7, 189.

- Lorient, D., Bracquart, P. et Alais, C. 1977. *Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique*, 17, 215.
- Lovenstein, H., Bjerrum, O.J., Weeke, B. 1975. *Scandinavian Journal of Immunology*, 4, Suppl. 2, 155.
- Macha, J. et Horak, F. 1972, in *Ewe's Milk*, Acta Universita Agricultura (Brno), Faculté Agronomique, 20, 1, 113.
- Mc Kenzie, H.A. 1971. *Milk Proteins*, Vol. 1 et 2, Academic Press, New-York.
- Mc Kinlay, A.G., West, D.W. et Manson, W. 1977. *European Journal of Biochemistry*, 76, 233.
- Manson, W., Carolan, T. et Annan, W.D. 1977. *European Journal of Biochemistry*, 78, 411.
- Masson, P. *La lactoferrine*. 1970. Ed. Arscia, Bruxelles.
- Masson, P. et Heremans, J.F. 1971. *Comparative Biochemistry and Physiology* 39B, 119.
- Mercier, J.C., Addea, F. et Pelissier, J.P. 1976. *Biochimie*, 58, 1303.
- Mercier, J.C., Brignon, G. et Ribadeau-Dumas, B. 1973. *European Journal of Biochemistry*, 35, 222.
- Mercier, J.C., Chobert, J.M. et Addeo, F. 1976. *FEBS Letters*, 72, 208.
- Mercier, J.C., Grosclaude, F. et Ribadeau-Dumas, B. 1971. *European Journal of Biochemistry*, 23, 41.
- Mercier, J.C., Hazé, G., Gaye, P. et Hue, D. 1978a. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, sous presse.
- Mercier, J.C., Hazé, G., Gaye, P. et Hue, D. 1978b. *Manuscrit en preparation*.
- Mercier, J.C., Uro, J., Ribadeau-Dumas, B. et Grosclaude, F. 1972. *European Journal of Biochemistry*, 27, 535.
- Milstein, C. Brownlee, G.G., Harrison, T.M. et Mathews, M.B. 1972. *Nature, New Biology*, 239, 117.
- Möller, A.B., Andrews, A.T. et Cheeseman, G.C. 1977. *Journal of Dairy Research*, 44, 277.
- Morrison, M. et Allen, P.Z. 1966. *Science*, 152, 1626.
- Nagasawa, T., Kato, R. et Kuwahara, K. 1972. *Journal of Dairy Science*, 55, 550.
- Naito, H. et Susuki, H. 1974. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38, 1543.
- Oeda, M. 1976. *Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College*, 25, 1.
- Patton, S. et Keenan, T.W. 1975. *Biochimica et Biophysica Acta*, 415, 273.
- Pélissier, J.P., en cours de publication.
- Petrilli, P., Chianese, L. et Addeo, F. 1978. *HRI/IDF Milk Proteins Symposium*, Ayr, Ecosse.

- Prieels, J.P., Maes, E., Dolmans, M. et Leonis, J. 1975. *European Journal of Biochemistry*, 60, 525.
- Reimerdes, E.H. et Herlitz, E. 1978. *HRI/IDF Milk Proteins Symposium, Ayr, Ecosse.*
- Reimerdes, E.H., Pérez-Jiménez, S. et Ringqvist, B.M. 1977. *Milchwissenschaft* 32, 207.
- Reiter, B. 1978. *Journal of Dairy Research*, 45, 131.
- Resmini, P., Semenza, F. et ZANINI, A. Ric; Sci. 37.
- Ribadeau-Dumas, B. 1968. *Biochimica et Biophysica Acta*, 168, 274.
- Ribadeau-Dumas, B. 1970. *Thèse, Orsay, France.*
- Ribadeau-Dumas, B., Brignon, G., Grosclaude, F. et Mercier, J.C. 1972. *European Journal of Biochemistry*, 25, 505.
- Ribadeau-Dumas, B., Grosclaude, F. et Mercier, J.C. 1975. *Modern Problems in Pediatrics*, 15, 46.
- Richardson, B.C. et Creamer, L.K. 1975. *Biochimica et Biophysica Acta*, 393, 37.
- Richardson, B.C. et Creamer, L.K. 1976. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 11, 46.
- Richardson, B.C., Creamer, L.K. et Munford, R.E. 1973. *Biochimica et Biophysica Acta*, 310, 111.
- Richardson, B.C. et Mercier, J.C. 1978. *European Journal of Biochemistry*, pour publication.
- Schmidt, D.G. 1978. *HRI/IDF Milk Proteins Symposium, Ayr Ecosse.*
- Schmidt, D.V. et Ebner, K.E. 1972. *Biochimica et Biophysica Acta*, 268, 714.
- Shore, A.L. et Reinhart, R.W. 1970. *Biochemical Journal* 118, 181.
- Shahani, K.M. 1966. *Journal of Dairy Science*, 49, 907.
- Shalichev, J. et Tanev, G. 1973. *Journal of Dairy Science*, 56, 171.
- Soulier, S., Ribadeau-Dumas, B. et Denamur, R. 1975. *European Journal of Biochemistry*, 50, 445.
- Spik, G., Vandersyppe, R., Montreuil, J., Han, K.K. et Tetaert, D. 1974. *FEBS Letters*, 38, 213.
- Testud, M. et Ribadeau-Dumas, B. 1973. *Biochimie*, 55, 1085.
- Toma, S.J. et Nakai, S. 1973. *Journal of Dairy Science*, 56, 1559.
- Vreeman, H.J., Both, P., Brinkhuits, J.A. et Van der Spek, C. 1977. *Biochimica et Biophysica Acta*, 491, 93.
- Yamauchi, K. et Kaminogawa, S. 1972. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 249.
- Zittle, C.A. et Custer, J.H. 1966. *Journal of Dairy Science*, 49, 788.