

ELEMENTS DE STRUCTURE PRIMAIRE DE L' α -LACTALBUMINE ET DE LA β -LACTOGLOBULINE DE BUFFLE

Francesco ADDEO, Jean-Claude MERCIER et Bruno RIBADEAU DUMAS

*Laboratoire de Recherches sur les Protéines, I.N.R.A.;C.N.R.Z.
78350, Jouy-en-Josas, France*

Received 23 January 1976

Summary

Although 150 individual samples of milk from Italian water buffalo (*Bubalus arnee*) were examined by acid and alkaline gel electrophoresis, no polymorphism was observed for α -lactalbumin and β -lactoglobulin. After isolation and purification of these two proteins their amino acid compositions were determined and compared with those of the corresponding bovine proteins. The sequence alignments of 36 and 17 amino-acids from the N-terminal ends and 2 amino-acids from the C-terminal ends of buffalo α -lactalbumin and β -lactoglobulin, respectively, have been established. Our results indicate that buffalo α -lactalbumin differs from its cow B counterpart by a substitution Asn/Gly at position 17 and by another substitution, likely Glu/Gln or Asp/Asn, at an unknown position. Buffalo β -lactoglobulin is homologous to the bovine B variant. Three substitutions differentiate the two proteins: Ile/Leu and Val/Ile at positions 1 and 162 respectively; a further one, Gln/Ile, has not yet been located. According to these results the B variant of bovine β -lactoglobulin might be the wild type of the *Bos* genus.

1. Introduction

Au cours d'études visant à étudier le déterminisme génétique des protéines du lait de vache (*Bos taurus*) et de zébu (*Bos indicus*) Aschaffenburg [1] et Grosclaude et al. [2] ont montré la présence dans ces deux espèces de 2 variants génétiques prédominants (A et B) de la β -lactoglobuline qui, selon toute vraisemblance, diffèrent par la même substitution Asp/Gly en position 64 de la chaîne peptidique. L'étude de la fréquence des deux allèles dans les différentes espèces et races étudiées ne permet pas de savoir quel est le variant primitif. Poursuivant nos recherches concernant la structure primaire des protéines du lait, il nous a paru intéressant de caractériser les protéines du lactosérum de buffle. Nous espérions, par l'étude

d'un genre voisin du genre *Bos*, pouvoir caractériser le type sauvage de la β -lactoglobuline bovine. D'autre part, nous désirions savoir si l' α -lactalbumine de buffle, qui migre, en électrophorèse à pH alcalin, au niveau du variant A bovin, correspondait à ce variant, très rare dans le genre *Bos*. Le buffle, et notamment l'espèce *Bubalus arnee* à laquelle appartient le buffle italien, fait, comme le genre *Bos*, partie de la tribu des *Bovinae*, mais appartient à un groupe différent: il ne peut être croisé avec les bovins et les zébus qui sont, eux, interfertiles. Les genres *Bos* et *Bubalus* ont divergé vers le milieu du miocène, bien avant l'apparition des espèces du genre *Bos* [3].

Dans ce travail, nous avons tenté de localiser, dans les séquences de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline du lait de buffle italien, les substitution d'acides aminés qui les distinguent des protéines homologues du lait de vache, dont les structures primaires complètes sont connues [4,5].

* Istituto di Industrie Agrarie dell'Università di Napoli,
Portici, Italie; boursier OTAN.

2. Matériel et méthodes

Cent cinquante échantillons de laits individuels ont été prélevés dans 7 élevages de la province de Caserta (Italie). Après écrémage, le lactosérum a été obtenu par précipitation isolélectrique des caséines. Un lait individuel a été utilisé pour la préparation de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline selon les techniques d'Aschaffenburg [6] et de Fox et al. [7] respectivement, suivies de chromatographies, sur DEAE-cellulose dans le premier cas [8], sur CM-cellulose dans le second selon Richardson et al. [9], mais en l'absence d'urée et de 2-mercaptopropanoïde.

Les électrophorèses en gel d'amidon ont été réalisées à pH 8,6 [10] et à pH 3,0 [11].

L' α -lactalbumine (fraction 3, figs.1 et 2) et la β -lactoglobuline (fig.2) purifiées ont été carboxyméthylées, dialysées et lyophylisées. Les analyses d'acides aminés ont été effectuées après hydrolyse sous vide par HCl 5,7 N à 110°C pendant des temps de 24, 48 et 96 h. Un analyseur d'acides aminés Beckman 'Multichrom' a été employé (une seule colonne; 3 tampons d'élution; durée d'analyse: 3h 20). Le tryptophane a été dosé selon Spies [12] et les acides sialiques selon Warren [13].

Les enchaînements C-terminaux ont été déterminés à l'aide de la carboxypeptidase A utilisée à 3 pH différents (5,4; 8,5 et 9,2) et de la carboxypeptidase B utilisée à pH 8,5.

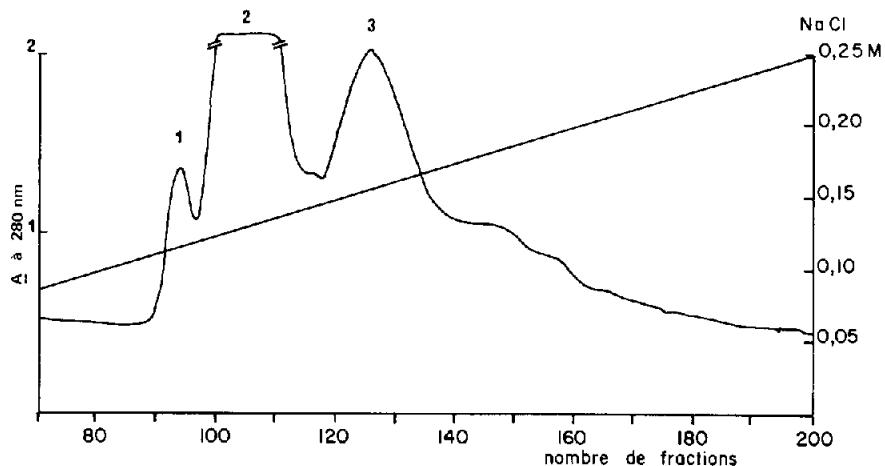


Fig.1. Diagramme d'élution de l' α -lactalbumine de buffle. 2,5 g de préparation brute; DEAE-cellulose microgranulaire, Whatman DE-32; colonne de 7 × 17 cm; tampon Tris 0,01 M, pH 7,2; fractions de 35 ml; élution par gradient linéaire de molarité en NaCl (0 à 0,25 M; 2 × 5 l).

La séquence N-terminale des protéines carboxyméthylées (environ 10 mg) a été déterminée à l'aide d'un 'Séquencer' Beckman 890 en utilisant un programme 'Diméthylbenzylamine' [14].

Les thiazolinones recueillies étaient converties en leurs dérivés hydantoïnes qui étaient extraits de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle. Ces dérivés

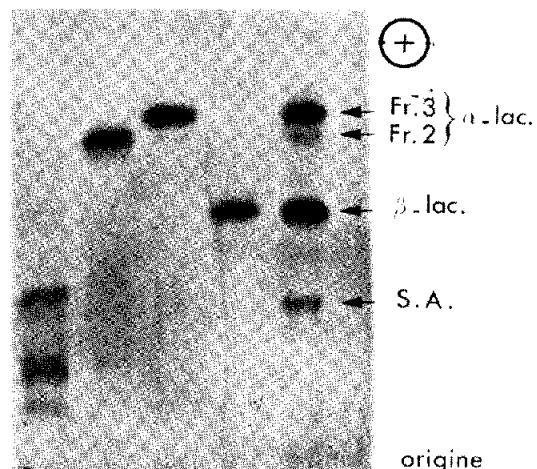


Fig.2. Electrophorèse des protéines purifiées utilisées dans cette étude. Gel d'amidon; tampon Tris-citrate pH 8,6; urée 7 M; 2-mercaptopropanoïde 3%; 4°C; 16 h. (1, 2, 3) Fractions 1, 2, 3 de la chromatographie représentée dans la fig.1. La fraction 3 (α -lactalbumine) a été utilisée; (4) β -lactoglobuline purifiée; (5) lactosérum total.

étaient identifiés, après silylation, par chromatographie en phase gazeuse [15]. L'extrait à l'acétate d'éthyle était, à chaque stade, examiné par chromatographie sur couche mince [16]. Pour identifier la PTH-Arg et la PTH-His dans la phase aqueuse, le réactif à la phénanthrène quinone et le réactif de Pauly ont été utilisés respectivement.

3. Résultats et discussion

Aucun polymorphisme n'a été observé pour l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline dans les 150 échantillons analysés. La mobilité électrophorétique de la β -lactoglobuline est identique à celle du variant B bovin, à pH alcalin ou acide. Par contre, l' α -lactalbumine, qui possède la mobilité du variant A bovin

à pH alcalin, comme plusieurs auteurs l'avaient déjà noté [17-20], migre au niveau du variant B à pH acide.

La composition en acides aminés de l' α -lactalbumine de buffle (tableau 1) est identique à celle du variant B bovin, mise à part la présence d'un résidu Asx supplémentaire et l'absence d'un résidu Gly. Ceci concorde parfaitement avec les résultats d'analyse séquentielle (fig.3) qui montrent une seule différence par rapport au variant B bovin dans les 36 résidus de l'extrémité N-terminale et les 2 résidus de l'extrémité C-terminale: le remplacement d'un résidu Gly par un résidu Asn en position 17. Il est à noter que les 3 α -lactalbumines dont la séquence complète est connue (celles du bœuf, de l'homme et du cobaye) ont un résidu Gly en position 17, comme le lysozyme humain [21,22]. Par contre cette position est occupée

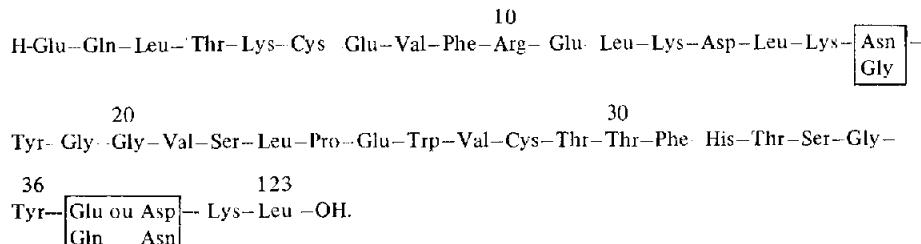
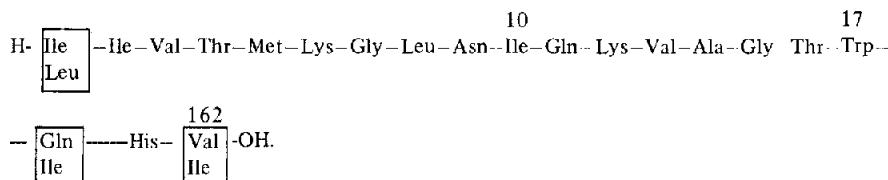
Tableau 1
Composition en acides aminés de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline de buffle

Acide aminé	α -Lactalbumine			β -Lactoglobuline			
	\bar{R}	Chiffre retenu	a	\bar{R}	a	b	c
Asp	21,68	22	21	14,73	15	15	15
Thr	7,09	7	7	7,75	8	8	8
Ser	6,83	7	7	6,82	7	7	7
Glu	12,76	13	13	25,83	26	25	25
Pro	1,89	2	2	8,31	8	8	8
Gly	5,09	5	6	4,21	4	4	4
Ala	2,91	3	3	15,02	15	15	15
SCM-Cys	7,64	8	8	4,96	5	5	5
Val	5,89	6	6	10,04	10	10	9
Met	1,16	1	1	3,88	4	4	4
Ile	8,12	8	8	9,15	9	9	10
Leu	13,05	13	13	20,97	21	22	22
Tyr	4,02	4	4	3,87	4	4	4
Phe	3,71	4	4	4,36	4	4	4
Trp	4,13	4	4	1,93	2	2	2
Lys	11,96	12	12	15,19	15	15	15
His	3,21	3	3	2,12	2	2	2
Arg	1,07	1	1	2,84	3	3	3
Nombre de résidus		123	123		162	162	162

(a) chiffres déduits de la séquence de l' α -lactalbumine B de vache [4];

(b) selon Ambrosino et al. [24];

(c) chiffres déduits de la séquence de la β -lactoglobuline B de vache [5]; \bar{R} , moyenne des chiffres de 3 X 3 hydrolyses de 24, 48 et 96 h. Les chiffres correspondant à Thr, Ser, Tyr et SCM-Cys ont été extrapolés au temps 0. Les valeurs correspondant à 96 h d'hydrolyse ont été retenues pour Ala et Ile.

α -lactalbumine β -lactoglobuline

Les résidus encadrés correspondent aux différences observées entre les protéines de buffle et de vache.

Fig.3. Eléments de séquence de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline de buffle.

par un résidu Asn dans la plupart des lysozymes aviaires qui ont été étudiés. En position 10, l' α -lactalbumine de buffle possède un résidu arginyle comme le variant B bovin. Rappelons que le variant A, qui est très rare et se rencontre surtout chez le zébu, possède un résidu Gln en position 10 [23]. On peut donc penser que l' α -lactalbumine de buffle correspond au variant B bovin. Néanmoins ces deux protéines n'ont pas la même mobilité à pH alcalin (différence correspondant à une charge), bien que leurs mobilités soient identiques à pH acide. Ceci indique que l' α -lactalbumine de buffle possède une charge négative supplémentaire provenant d'un résidu glutamyle ou aspartyle. Au vu des compositions en acides aminés des protéines correspondantes, on peut penser qu'elles diffèrent par une seconde substitution, Glu/Gln ou Asp/Asn, qui n'a pas été localisée. La fraction 3 analysée contient une faible quantité d'acide sialique (0,15 M / 18 000 g). La fraction 2 (figs.1 et 2), en cours d'étude, ne contient pas d'acide sialique et présente une composition en acides aminés proche de celle de la fraction 3.

La composition en acides aminés de la β -lactoglobuline de buffle (tableau 1) est voisine de celle rapportée par Ambrosino et al. [24]. Comparée à

celle de la β -lactoglobuline bovine elle n'en diffère que d'une unité pour les résidus Ile, Leu, Glx et Val. La séquence C-terminale déterminée, —His—Val-OH, est identique à celle trouvée par Ambrosino et al. Elle correspond à celle des β -lactoglobulines de brebis et de chèvre [24]. Chez la vache, un résidu isoleucyle a été trouvé en position C-terminale [4]. Parmi les 17 acides aminés de l'extrémité N-terminale, seul le premier résidu, Ile, est différent de ce que l'on observe pour la β -lactoglobuline B bovine (Leu). Il est à noter que Liberatori et al. [19] avaient trouvé, comme résidus N-terminaux de la β -lactoglobuline de buffle, aussi bien d'ailleurs que pour les protéines correspondantes de chèvre et de brebis, des quantités à peu près égales de Leu et Ile (environ 0,6 M/M de protéine). Ceci s'explique vraisemblablement par une épimérisation partielle de l'isoleucine que l'on observe fréquemment avec la méthode de Stark et Smith [25]. L'alloisoleucine peut facilement être confondue avec la leucine sur l'analyseur d'acides aminés. La compilation des résultats de l'analyse séquentielle (fig.3) et de l'étude de la composition en acides aminés semble indiquer que la β -lactoglobuline de buffle et le variant B ne diffèrent que par 3 substitutions: Ile/leu (Position 1); Glx/Ile; Val/Ile (position 162). Le résidu Glx mentionné

est certainement un résidu Gln au vu de la comparaison des mobilités électrophorétiques des deux protéines. La présence d'un résidu Asn en position 9 correspond à ce qui a été observé par Grosclaude et al. chez la vache [26] et est en désaccord avec les résultats de Braunitzer et al. [5]. Selon toute vraisemblance, nos résultats indiquent que les résidus Gly et Val se trouvent respectivement en positions 64 et 118, et donc que la β -lactoglobuline de buffle est l'homologue du variant B bovin qui est probablement le variant ancestral.

Remerciements

Nous remercions vivement F. Grosclaude d'avoir lu la première version de ce texte avec suffisamment d'attention pour détecter une erreur grossière d'interprétation des résultats.

References

- [1] Aschaffenburg, R. (1968) *J. Dairy Res.* 35, 447-460.
- [2] Grosclaude, F., Mahe, M. F. et Mercier, J. C. (1974) *Ann. Génét. Sél. anim.* 6, 305-329.
- [3] Mason, I. L. (1974) in: *The Husbandry and Health of the Domestic Buffalo* (Cockrill, W. R. ed.) p. 1147, FAO, Rome.
- [4] Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C. et Hill, R. H. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4570-4582.
- [5] Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. et Stangl, A. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 832-834.
- [6] Aschaffenburg, R. (1968) *J. Dairy Sci.* 51, 1295-1296.
- [7] Fox, K. K., Holsinger, V. H., Posati, L. P. et Pallansch, M. J. (1967) *J. Dairy Sci.* 50, 1363-1367.
- [8] Cervone, F., Diaz Brito, J., Di Prisco, G., Garofano, F., Gutierrez-Noronha, L., Traniello, S. et Zito, R. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 295, 555-563.
- [9] Richardson, B. C., Creamer, L. K. et Munford, R. E. (1973) 310, 111-117.
- [10] Schmidt, D. G. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 90, 411-414.
- [11] Peterson, R. F. et Kopfler, F. C. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388-392.
- [12] Spies, J. (1967) *Anal. Chem.* 39, 1412-1416.
- [13] Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1971-1975.
- [14] Hermodson, M. A., Kuhn, R. W., Wash, K. A., Neurath, H., Eriksen, N. et Benditt, E. P. (1972) *Biochemistry* 16, 2934-2938.
- [15] Pisano, J. J., Bronzert, J. T. et Brewer, H. B. (1972) *Anal. Biochem.* 45, 43-59.
- [16] Jeppson, J. O. et Sjoquist, J. (1967) *Anal. Biochem.* 18, 264-269.
- [17] Sen, A. et Sinha, N. K. (1961) *Nature*, 190, 343-344.
- [18] Mawal, R. B., Barnabas, T. et Barnabas, J. (1965) *Nature* 205, 175-176.
- [19] Liberatori, J., Ambrosino, C. et Conti, A. (1969) *Ric. Sci.* 39, 684-690.
- [20] Bettini, T. M. et Masina, P. (1972) *Prod. Anim.* 11, 107-126.
- [21] Findlay, J. B. C. et Brew, K. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 65-86.
- [22] Brew, K. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 341-353.
- [23] Bell, K., Hopper, K. E., Mc Kenzie, H. A., Murphy, W. H. et Shaw, D. C. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 214, 437-444.
- [24] Ambrosino, C., Cauvin, E., La Vecchia, L., Liberatori, J. et Michelin-Lausarot, P. (1969) *Ric. Sci.* 39, 909-919.
- [25] Narita, K. (1970) in: *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B. ed.) pp. 49-54, Springer-Verlag, Berlin.
- [26] Grosclaude, F., Mercier, J. C. et Mahe, M. F., Communication personnelle.