

Synthèse des protéines du lait

J.-P. PÉLISSIER, B. RIBADEAU-DUMAS

Laboratoire de Biochimie et Technologie Laitières,
I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas, France.

Summary. *The synthesis of milk proteins.*

This review, written for non-specialists, describes briefly the steps of protein biosynthesis from their precursors in the blood to the excreted molecules, taking rat γ -casein as an example. A schematic description is given of the procedures employed for preparing cDNAs which can provide the sequences of the corresponding mRNAs and proteins. Recent findings concerning milk proteins are briefly mentioned, and in particular those dealing with sequence determinations of mRNAs coding for milk proteins from several species.

Le lait a des points communs avec toutes les sécrétions exocrines qui contiennent en particulier un ensemble de facteurs, protéiques pour la plupart, qui semblent destinés à assurer une protection efficace locale contre les microorganismes. Mais il s'en différencie fondamentalement par le fait qu'il doit contenir tous les nutriments nécessaires à la survie et à la croissance du jeune. C'est dire que la glande mammaire est un site de biosynthèse particulièrement actif pendant la lactation. En effet, nous le verrons, la très grande majorité de ces nutriments est synthétisée *in situ* à partir de précurseurs apportés par le sang. C'est le cas de la quasi-totalité des protéines, de la totalité du lactose, de la totalité des lipides. Une partie importante des minéraux majeurs du lait (phosphate et calcium, apportés par voie sanguine) se transforme dans la glande mammaire, en association avec les caséines, en un phosphate de calcium complexe de type « brushite » qu'on appelle le « phosphate colloïdal » (D. S. Horne, communication personnelle).

Dans ce qui suit, nous ne nous intéresserons qu'aux protéines, restant ainsi dans notre spécialité qui concerne ce que l'on peut considérer comme la fraction la plus aisément valorisable du lait.

I. Précurseurs des protéines du lait.

Les précurseurs des protéines, dans tous les tissus, dans toutes les cellules, sont des acides aminés exclusivement. Ceux-ci proviennent essentiellement des protéines alimentaires qui sont dégradées progressivement tout au long du tractus digestif et, *in fine*, dans les entérocytes qui ne transmettent pratiquement que des

acides aminés libres aux cellules sécrétrices mammaires, par la voie sanguine. Ces acides aminés, qui sont transportés à travers la paroi des capillaires sanguins et la membrane basolatérale des cellules sécrétrices vers le cytosol de celles-ci par un mécanisme mal connu, ne sont pas tous utilisés tels quels pour la synthèse des protéines du lait. Il faudrait en effet que les proportions relatives des acides aminés prélevés dans le sang reflètent fidèlement les proportions correspondantes dans l'ensemble des protéines synthétisées. Si ceci est vrai pour certains acides aminés essentiels (Met, Tyr, Phe, His et Trp), cela ne l'est pas pour les autres (Thr, Val, Ile, Leu, Lys, et Arg) qui sont prélevés en excès par la glande mammaire. Les premiers sont utilisés directement pour la synthèse protéique, comme une partie des seconds. La partie restante est métabolisée dans la glande mammaire. L'aginine est convertie en proline. Les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (Val, Leu, Ile) peuvent soit fournir de l'énergie, soit servir à la synthèse d'acides aminés non essentiels.

Si les acides aminés non essentiels peuvent être utilisés tels quels, il se produit néanmoins dans la glande mammaire des modifications importantes de leurs proportions relatives de façon à adapter la production de protéines aux matières premières que sont les acides aminés prélevés, l'acétate, le propionate et le glucose. La transamination des oxo-acides, produits à partir de ces 3 derniers métabolites par l'intermédiaire du cycle de Krebs, permet cette adaptation.

L'énergie requise pour la synthèse protéique nécessite en outre 3 moles d'ATP par mole de résidu d'acide aminé incorporé, soit environ 30 mmol d'ATP par g de protéine chez la vache. La plus grande partie de cet ATP provient de l'ADP au cours de l'oxydation du NADH. Ce dernier résulte de l'oxydation de l'acétyl-Co A par la voie du cycle de Krebs. Un apport d'énergie est donc requis pour la synthèse protéique. Il provient principalement du glucose, de l'acétate (surtout chez les ruminants), des acides gras, et, dans une moindre mesure, des acides aminés (Smith *et al.*, 1983).

Certaines protéines du lait ne sont pas synthétisées dans les cellules sécrétrices mammaires et proviennent soit directement du sang (IgG chez la vache, sérum albumine), soit de plasmocytes logés dans le tissu interstitiel (IgA).

II. Les principales étapes de la synthèse des protéines.

Nous rappellerons ici, de façon très simplifiée, les étapes qui permettent le passage du gène à la protéine, étapes étroitement imbriquées, qui ne sont séparées ci-dessous que dans un souci de clarté.

On admet que chaque chromosome est constitué d'une seule gigantesque molécule d'ADN et que le patrimoine héréditaire est sensiblement identique dans toutes les cellules d'un même organisme. A chaque protéine comme celles qui sont fabriquées par la glande mammaire correspond un gène, c'est-à-dire un segment d'ADN parfaitement défini. Parmi les protéines du lait, les 4 caséines sont « codées » par des gènes situés sur le même chromosome et proches les uns des autres (Grosclaude, 1979).

La première étape de la biosynthèse est l'activation, c'est-à-dire la mise en activité, du système de transcription en ARN messagers des gènes codant pour

les protéines du lait. Cette étape, dont l'induction et la régulation sont de nature hormonale, sera décrite par d'autres. Elle concerne également la mise en activité i) des gènes codant pour toutes les enzymes des voies métaboliques conduisant à la biosynthèse du lactose, des acides gras, des triglycérides et des acides ribonucléiques, ii) des gènes codant pour les différents éléments constitutifs de la machinerie cellulaire (ARN ribosomaux et de transfert, protéines ribosomales et protéines du réticulum...). Elle se traduit notamment par une « décondensation » des régions des chromosomes correspondant aux gènes activés (ce qui permet leur transcription), par un accroissement très important du réticulum endoplasmique et par une forte augmentation du nombre de ribosomes liés à ce réticulum.

La deuxième étape, que nous avons séparée ici artificiellement de la première, est la transcription du gène correspondant à une protéine donnée en ARN pré-messager (pré-ARNm) à partir de nucléotides libres par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II. Le gène et sa copie comportent le plus souvent, chez les eucaryotes, un nombre de nucléotides très supérieur à celui requis pour le codage de la protéine. Ainsi, le gène de structure de la caséine γ de rate est constitué de 15 000 nucléotides environ, alors qu'il en faut seulement 540 pour coder la protéine (Yu-Lee et Rosen, 1983).

Dans une troisième étape, qui a lieu dans le noyau comme la précédente, le pré-ARNm est considérablement modifié puis raccourci. Schématiquement, ces modifications comprennent l'addition d'un « chapeau » (Cap), dérivé de l'acide guanylique, à ce qui sera l'extrémité 5' du messenger final, la méthylation de certaines bases et l'addition d'une « extrémité poly A », c'est-à-dire une suite continue de résidus adénylates, en nombre variable (une cinquantaine pour les messagers des protéines du lait). Le raccourcissement, particulièrement important dans le cas que nous avons évoqué, est dû à l'élimination (excision) de segments (introns) du pré-ARNm et à l'épissage (splicing) des segments restants (exons). Si l'on a maintenant des idées assez précises sur les « signaux » présents dans la séquence du pré-ARNm, responsables de ces modifications, les mécanismes de leur mise en jeu, et surtout leur rôle, restent en revanche mal connus. L'excision des introns modifie considérablement le pré-ARNm : dans le cas de la caséine γ de rate, l'ARNm ne contient plus que 869 nucléotides (contre 15 000, rappelons-le, pour le pré-ARNm), sans compter l'extrémité poly A. Le rapport longueur d'introns totale sur longueur d'exons totale est de 16/1, un des plus élevés que l'on connaisse. La région codante de l'ADN est en fait constituée de l'union d'au moins 9 petits exons séparés par de grands introns (Yu-Lee et Rosen, 1983).

L'ARNm, dans la quatrième étape, sort du noyau et va être traduit au niveau des ribosomes. Les acides aminés nécessaires à la synthèse de la protéine considérée sont chacun fixés de façon covalente, par l'intermédiaire d'une aminoacyl ARNt synthétase spécifique, à l'un des ARNt spécifiques de l'acide aminé considéré, dont l'anticodon s'appariera au codon correspondant de l'ARN messenger, cet appariement se réalisant sur un ribosome. L'initiation, beaucoup plus complexe en fait que ce qui sera schématisé ici, commence par l'appariement d'un ribosome avec un site spécifique du messenger situé en amont de la partie codante. En effet, nous l'avons vu, le messenger, indépendamment de la partie poly A, est encore nettement plus long que ce qui est strictement « nécessaire » à

la synthèse de la protéine : 869 nucléotides pour 540 nucléotides codants dans l'exemple que nous avons pris. Dans cet exemple, le messager comprend des parties 5' non codante et 3' non codante d'environ 60 et 269 nucléotides respectivement, qui sont situées de part et d'autre de la partie codante. L'une des fonctions connues de la partie 5' non codante par où commence la traduction en direction 5' → 3' est précisément de porter les séquences nécessaires à la reconnaissance de cette partie par le système de traduction. La traduction commence lorsque le ribosome, qui se déplace en direction 3', reconnaît le premier codon AUG qu'il trouve, ce qui permet l'appariement avec l'anticodon de l'ARNt initiateur chargé d'une méthionine. Sans entrer dans le détail de l'élongation subséquente de la chaîne peptidique, mécanisme fort complexe comme les précédents, mais bien connu, disons seulement qu'elle résulte de la fixation sur le ribosome de l'ARNt chargé de l'acide aminé correspondant au 2^e codon, de la formation d'une liaison peptidique entre la méthionine et cet acide aminé, du départ de l'ARNt initiateur déchargé, et ainsi de suite. La traduction se termine lorsque le ribosome rencontre l'un des 3 codons de terminaison.

III. Modifications post-traductionnelles.

Elles ont été particulièrement étudiées, dans le cas des protéines du lait, par Mercier et Gaye (1983). D'une manière générale, la chaîne protéique issue de la traduction peut être soit utilisée telle quelle, soit modifiée plus ou moins profondément. Les modifications apportées, avant ou après la fin de la traduction, peuvent être de deux types : ce sont, soit des coupures de la chaîne peptidique, soit des ajouts nécessaires au fonctionnement de la protéine.

Les coupures mentionnées peuvent avoir pour objet l'élimination d'un segment « signal » qui a permis à la protéine d'atteindre le compartiment où elle « doit » se rendre. Elles peuvent aussi permettre la production, à partir d'une protéine inactive, d'un ou plusieurs fragments actifs en un lieu ou à un moment précis.

Dans le cas des protéines du lait, protéines exportées vers la lumière de l'acinus mammaire, la chaîne peptidique en cours de synthèse se lie par son extrémité N terminale à une particule ribonucléoprotéique (SRP, signal recognition particle) qui permet la fixation du complexe ribosome-SRP sur un récepteur du réticulum et la translocation de la chaîne naissante à travers sa membrane. Ce mécanisme n'est possible que pour les chaînes peptidiques possédant un segment N terminal de structure particulière, très hydrophobe, le « peptide signal », peptide qui est excisé très précocement par une « signal peptidase » fixée à la face interne de la membrane du réticulum. Dans le cas des protéines du lait, le peptide signal a une longueur de 15 à 21 résidus d'acides aminés (Mercier et Gaye, 1983).

Certaines des protéines du lait sont phosphorylées ou glycosylées. L'addition de groupements phosphates et de groupements glucidiques a lieu dans le réticulum endoplasmique lisse et dans l'appareil de Golgi, lieux de passage successifs de la chaîne néosynthétisée (Mercier et Gaye, 1983).

IV. Excrétion.

La plus grande partie des constituants majeurs non lipidiques du lait, principales protéines, lactose, une grande partie des minéraux, se trouve concentrée dans des vésicules qui se détachent de l'appareil de Golgi. L'accumulation du lactose dans ces vésicules (qui entraîne un appel d'eau important) est due à l'interaction de l' α -lactalbumine, synthétisée comme indiqué ci-dessus, et d'une galactosyl transférase liée à la face interne des vésicules. L' α -lactalbumine en excès modifie la spécificité de substrat de l'enzyme, qui utilise alors le glucose comme accepteur du galactose, d'où le nom de lactose synthétase donné au complexe galactosyl transférase — α -lactalbumine (Kuhn, 1983). L'accumulation de phosphate et de calcium dans les vésicules d'origine golgienne, qui conduit à la formation des micelles de caséine, est encore mal connue. Elle est probablement consécutive à la phosphorylation des caséines.

L'excrétion finale dans la lumière acinaire est une exocytose classique au cours de laquelle les vésicules d'origine golgienne se lient à la membrane plasmique apicale et déversent leur contenu à l'extérieur de la cellule sécrétrice.

V. Recherches actuelles dans le domaine de la biosynthèse et de la structure des protéines du lait.

L'étude directe de la structure primaire des protéines du lait a été intense vers les années 70. Elle est actuellement terminée pour l'essentiel : les structures de toutes les protéines majeures du lait de vache (caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ ; α -lactalbumine, β -lactoglobuline) étaient connues en 1977. Celles des protéines homologues d'un bon nombre d'espèces ont été ensuite élucidées (Davies *et al.*, 1983). Une nouvelle protéine phosphorylée (Wp-protein ou WAP) a été isolée et caractérisée récemment dans le lactosérum de laits de rongeurs où elle est assez abondante (Dandekar *et al.*, 1982 ; Hennighausen et Sippel, 1982). La β -lactoglobuline, que l'on considérait autrefois comme spécifique du lait des ruminants, a été mise en évidence dans les laits de jument (Conti *et al.*, 1984) et de truie (Bell *et al.*, 1981). Dans ces espèces elle existe à l'état de monomères et ne possède pas de groupement SH libre. Par contre, elle semble bien être absente du lait de femme (Brignon *et al.*, 1985). Ce lait apparaît dépourvu des caséines α_{s1} et α_{s2} . Les structures primaires des caséines β et κ et de la lactoferrine humaines ont été déterminées récemment (Greenberg *et al.*, 1984 ; Brignon *et al.*, 1985 ; Metz-Boutigue *et al.*, 1984).

De nouvelles informations concernant notamment la structure primaire, la biosynthèse et l'évolution des protéines du lait ont été obtenues grâce à la détermination récente de la séquence nucléotidique des ARNm qui les codent chez diverses espèces : la vache (Stewart *et al.*, 1984 ; Nagao *et al.*, 1984), la brebis (Mercier *et al.*, 1985 ; Boissard et Pétrissant, 1985), la rate (Dandekar *et al.*, 1982 ; Blackburn *et al.*, 1982 ; Hobbs et Rosen, 1982 ; Qasba et Safaya, 1984 ; Nakhasi *et al.*, 1984), la souris (Hennighausen et Sippel, 1982 ; Hennighausen *et*

al., 1982), le cobaye (Hall *et al.*, 1982, 1984a, 1984b) et la femme (Hall *et al.*, 1982). Les séquences ont été déduites de celles des cADN correspondants (copies ADN des ARNm).

Le principe de la préparation d'un cADN, schématisé très grossièrement est le suivant.

La copie d'un ARNm par la transcriptase inverse en présence des 4-désoxyribonucléotides est un hybride ARNm-ADN. On peut éliminer le brin d'ARN et le remplacer enzymatiquement, en présence des 4-désoxyribonucléotides, par un brin d'ADN complémentaire.

Le produit ainsi formé est le cADN double brin complet correspondant à l'ARNm de départ.

Dans les faits les choses sont considérablement plus compliquées. Il y a en effet, dans une cellule sécrétrice mammaire en activité, un ensemble d'ARNm correspondant à toutes les protéines en voie de synthèse, ensemble dont il est généralement impossible d'isoler un ARNm particulier. Il existe pourtant des techniques courantes permettant de préparer l'ensemble des ARNm — poly A à partir d'un fragment de tissu, et d'en faire éventuellement un fractionnement grossier suivant la taille. L'expression d'une fraction ARNm — poly A en système acellulaire, et la comparaison par électrophorèse des produits d'expression et de la protéine d'intérêt, permet de voir si telle ou telle fraction contient, parmi d'autres, l'ARNm codant pour cette protéine. Tous les ARN de la fraction considérée sont transformés en cADN par traitement de cette fraction comme décrit ci-dessus.

Les extrémités des cADN sont modifiées de façon à permettre leur insertion dans des vecteurs (plasmides en général). Les plasmides utilisés, tous identiques les uns aux autres, sont linéarisés par coupure en un point précis à l'aide d'une « enzyme de restriction ». Chaque cADN sera fixé par l'une ou l'autre de ses extrémités à une extrémité du plasmide linéarisé. L'ensemble est enfin « recircularisé ». On obtient un mélange de « plasmides recombinants » circulaires, qui ne diffèrent entre eux que par l'ADNc inséré (qui peut être complet ou partiel, selon l'état de l'ARNm de départ). Ce mélange est ensuite utilisé pour « transformer » une souche de bactéries appropriées (*E. coli* en général). Les bactéries incorporeront au hasard les différents plasmides qui feront alors partie de leur patrimoine génétique et seront transmis à la descendance de chacune d'elles, bien qu'ils ne s'intègrent pas au chromosome.

Après étalement sur boîtes de Petri, chaque bactérie transformée donne naissance à une colonie, un clone, dans laquelle toutes les cellules sont identiques, possédant chacune le même plasmide. Il faut alors repérer les clones qui ont le plus de chance de renfermer le cADN complet que l'on veut préparer en grande quantité pour en déterminer la séquence nucléotidique. Plusieurs techniques sont utilisées. On peut, par exemple, préparer une sonde cADN marquée, à partir d'une fraction d'ARNm que l'on sait, par traduction *in vitro* et électrophorèse, contenir une proportion importante de l'ARNm d'intérêt. Par des techniques appropriées, on transfère directement, à partir d'un grand nombre de colonies réparties sur boîtes de Petri, une partie de l'ADN contenu dans chaque colonie sur feuilles de nitrocellulose pour former une « réplique ». Les taches correspon-

dant aux colonies contenant notamment tout ou partie du cADN recherché seront révélées par traitement avec la sonde marquée (hybridation) et autoradiographie.

La détermination, par électrophorèse, de la taille des plasmides extraits de chaque colonie positive donnera une idée de la taille des cADN insérés, ce qui pourra être confirmé directement, après libération du cADN inséré sous l'action sur le plasmide de l'enzyme de restriction utilisé pour l'insertion, par électrophorèse sur gel. Pour terminer, le clone le plus intéressant est cultivé en milieu liquide de façon à obtenir un grand nombre de cellules dont le cADN sera préparé comme précédemment. La détermination de sa séquence nucléotidique permettra d'en déduire la structure primaire de la pré-protéine correspondante (peptides signal + protéine). D'autres informations concernant notamment la régulation de la traduction et l'évolution phylogénique peuvent également être obtenues par l'étude des extrémités 5' et 3' non codantes.

A partir des études effectuées sur les protéines elles-mêmes, on a pu montrer que la vitesse d'évolution phylogénique des peptides signaux était considérablement plus lente que celle des protéines du lait correspondantes, et que les peptides signaux des 3 caséines « sensibles au calcium » (α_{s1} , α_{s2} et β) présentaient de fortes homologies (Mercier et Gaye, 1983).

L'étude des cADN correspondant aux protéines majeures du lait a confirmé ces découvertes et montré en outre une conservation remarquable, au cours de l'évolution, de la structure des parties non codantes des mARN, contrastant avec une évolution très rapide des parties codantes, c'est-à-dire des protéines elles-mêmes. Seuls quelques courts segments peptidiques, correspondant essentiellement aux régions phosphorylées, apparaissent conservés au cours de l'évolution.

Les séquences des « pré-WAP » de souris et de rate ont été déduites de celles des cADN correspondants et comparées. Ces protéines sont constituées respectivement de 134 et 137 résidus d'acides aminés. Comme les caséines, elles semblent avoir évolué très rapidement. Cependant, on observe la même conservation du peptide signal et des parties non codantes du ARNm.

La WAP de rate seule semble être phosphorylée. Les deux protéines contiennent un nombre important de ponts disulfures en positions similaires. Elles présentent une homologie importante avec un inhibiteur de protéase de tortue sans pour autant qu'on leur ait trouvé pour l'instant une telle activité. La disposition de leurs ponts disulfures suggère également une « parenté » avec la famille des protéines à « four-disulfide core » dont font partie des lectines végétales et la neurophysine.

Pour *conclure* cette courte revue, il faut signaler l'importance des travaux entrepris depuis quelques années pour connaître les gènes correspondant aux protéines du lait. On peut penser que le mécanisme d'induction hormonale de la biosynthèse des protéines sera par-là même prochainement élucidé. On peut aussi penser que, dans un avenir plus lointain, il deviendra possible de modifier le génome chez des espèces laitières.

Références

- BELL K., MCKENZIE H. A., SHAW D. C., 1981. Porcine β -lactoglobulin A and C. Occurrence, isolation and chemical properties. *Mol. cell. Biochem.*, **35**, 103-111.
- BLACKBURN D. E., HOBBS A. A., ROSEN J. M., 1982. Rat β -casein cDNA : sequence analysis and evolutionary comparison. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 2295-2307.
- BOISNARD M., PÉTRISSANT G., 1985. Complete sequence of ovine α_{s2} -casein messenger RNA. *Biochimie*, **67**, 1043-1051.
- BRIGNON G., CHTOUROU A., RIBADEAU-DUMAS B., 1985. Preparation and amino acid sequence of human κ -casein. *FEBS Letters*, **188**, 48-54.
- CONTI A., GODOVAC-ZIMMERMAN J., LIBERATORI J., BRAUNITZER G., 1984. The primary structure of monomeric β -lactoglobulin I from horse colostrum (*Equus caballus*, Perissodactyla). *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **365**, 1393-1401.
- DANDEKAR A. M., ROBINSON E. A., APPELLA E., QASBA P. K., 1982. Complete sequence analysis of cDNA clones encoding rat whey phosphoproteins : homology to a protease inhibitor. *Proc. nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 3987-3991.
- DAVIES D. T., HOLT C., CHRISTIE W. W., 1983. The composition of milk, 71-117. In MEPHAM T. B., *Biochemistry of lactation*, Elsevier, Amsterdam.
- GREENBERG R., GROVES M. L., DOWER H. J., 1984. Human β -casein. Amino acid sequence and identification of phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.*, **259**, 5132-5138.
- GROSCLAUDE F., 1979. Polymorphism of milk proteins : some biochemical and genetical aspects. *Proc. 16th int. Conf. anim. Blood Grps. Biochem. polymorphisms*, Vol. 1, Int. Soc. anim. Blood Group Res., Leningrad, 54-92.
- HALL L., CRAIG R. K., EDBROOKE M. R., CAMPBELL P. N., 1982. Comparison of the nucleotide sequence of cloned human and guinea-pig pre- α -lactalbumin cDNA with that of chick prelysozyme cDNA suggests evolution from a common ancestral gene. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 3503-3515.
- HALL L., LAIRD J. E., PASCALL J. C., CRAIG R. K., 1984a. Guinea-pig casein A cDNA. Nucleotide sequence analysis and comparison of the deduced protein sequence with that of bovine α_{s2} -casein. *Eur. J. Biochem.*, **138**, 585-589.
- HALL L., LAIRD J. E., CRAIG R. K., 1984b. Nucleotide sequence determination of guinea-pig casein B mRNA reveals homology with bovine and rat α_{s1} -caseins and conservation of the non-coding regions of the mRNA. *Biochem. J.*, **222**, 561-570.
- HENNIGHAUSEN L. G., SIPPEL A. E., 1982. Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of « four-disulfide core » proteins. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 2677-2684.
- HENNIGHAUSEN L. G., STEUDLE A., SIPPEL A. E., 1982. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for mouse ϵ -casein. *Eur. J. Biochem.*, **126**, 569-572.
- HOBBS A. A., ROSEN J. M., 1982. Sequence of rat α - and γ -casein mRNAs : evolutionary comparison of the calcium-dependent rat casein multigene family. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 8079-8097.
- KUHN N. J., 1983. The biosynthesis of lactose, 159-179. In MEPHAM T. B., *Biochemistry of lactation*, Elsevier, Amsterdam.
- MERCIER J. C., GAYE P., 1983. Milk protein synthesis, 177-277. In MEPHAM T. B., *Biochemistry of lactation*, Elsevier, Amsterdam.
- MERCIER J. C., GAYE P., SOULIER S., HUE-DELAHAIE D., VILOTTE J. L., 1985. Construction and identification of recombinant plasmid carrying cDNAs coding for α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -caseins and β -lactoglobulin. Nucleotide sequence of α_{s1} -casein cDNA. *Biochimie*, **67**, 959-971.
- METZ-BOUTIGUE M. H., JOLLES J., MAZURIER J., SCHOENTGEN F., LEGRAND D., SPIK G., MONTREUIL J., JOLLES P., 1984. Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparison with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, **145**, 659-676.
- NAGAO M., MAKI M., SASAKI R., CHIBA H., 1984. Isolation and sequence analysis of bovine α_{s1} -casein cDNA clone. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1663-1667.
- NAKHASI H. L., GRANTHAM F. H., GULLINO P. M., 1984. Expression of κ -casein in normal and neoplastic rat mammary gland is under the control of prolactin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14894-14898.

- QASBA P. K., SAFAYA S. K., 1984. Similarity of the nucleotide sequence of rat α -lactalbumin and chicken lysozyme genes. *Nature*, **308**, 377-380.
- SMITH G. H., CRABTREE B., SMITH R. A., 1983. Energy metabolism in the mammary gland, 121-140. In MEPHAM T. B., *Biochemistry of lactation*, Elsevier, Amsterdam.
- STEWART A. F., WILLIS I. M., MACKINLAY A. G., 1984. Nucleotide sequences of bovine α_{s1} - and κ -casein cDNAs. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 3895-3907.
- YU-LEE L. Y., ROSEN J. M., 1983. The rat multigene family. I. Fine structure of the γ -casein gene. *J. biol. Chem.*, **258**, 10794-10804.
-