

50376
1977
168

50376
1977
168

Numéro d'ordre : 382

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES
OPTION BIOCHIMIE

par

Danièle WOUTERS-TYROU



LES HISTONES DE GONADES D'OURSIN *Psammechinus Miliaris*

(Isolement , Caractérisation , Etudes structurales)

présentée le 23 Mai 1977 devant la Commission d'Examen

MM. J. MONTREUIL, Président
MM. G. BISERTE, P. JOLLES, Mlle M. CHAMPAGNE, Rapporteurs
MM. M. DURCHON, P. SAUTIERE

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses (U. 124 INSERM) et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur: Professeur Gérard BISERTE), sous la direction de Monsieur Pierre SAUTIERE, Maître de Recherches au C.N.R.S.

Ce travail a bénéficié de l'aide de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrats n° 71.5.022.2 et 74.5.059.2).

Il a fait l'objet des présentations et publications suivantes :

Présentations :

- Primary structure of histone H2A from sea urchin gonad (1974), 9th FEBS Meeting, BUDAPEST.
- Structure primaire des histones H2A (affiche),
D. WOUTERS-TYROU, B. LAINE, P. SAUTIERE et
G. BISERTE,
Journées franco-belges de Biochimie, LILLE, 24-26 juin 1976.

Publications :

- Purification and characterization of glycine, arginine, lysine-rich and alanine, leucine, glycine-rich histones from sea urchin gonad,
D. WOUTERS-TYROU, P. SAUTIERE et G. BISERTE,
Biochim. Biophys. Acta, 1974, 342, 360-366.
- Structure of histone H2A (histone ALK, I1b1 or F_{2a2}),
P. SAUTIERE, D. WOUTERS-TYROU, B. LAINE et
G. BISERTE,
in " The Structure and Function of Chromatin ", Ciba Foundation Symposium 28. Edited by Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, 1975.
- Covalent Structure of the Sea Urchin Histone H4,
D. WOUTERS-TYROU, P. SAUTIERE et G. BISERTE,
FEBS Letters, 1976, 65, 225-228.

A mon Président de Thèse

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

*Professeur de Chimie Biologique à l'Université
des Sciences et Techniques de Lille I*

Au cours de mes études à la Faculté des Sciences, j'ai eu l'occasion d'apprécier votre Enseignement, dispensé d'une façon si claire et si passionnante.

C'est dans votre Laboratoire qu'ensuite j'ai fait mes premiers pas dans la Recherche Biochimique.

Je vous remercie pour le grand honneur que vous me faites en acceptant de présider le Jury de cette Thèse et je vous prie de croire en mon profond respect.

A mes Juges

Monsieur le Professeur Gérard BISERTE,

*Professeur de Biochimie Pathologique à la Faculté
de Médecine de Lille,*

*Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer
de Lille et de l'Unité n° 124 de l' I.N.S.E.R.M.*

Cette Thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute ma reconnaissance pour la Bienveillance avec laquelle vous m'avez accueillie dans votre Laboratoire et pour l'intérêt constant que vous avez porté à l'avancement de mes recherches au cours de ces huit années.

L'étendue immense de vos connaissances, de même que la sûreté de vos jugements et vos grandes qualités humaines ont toujours provoqué mon admiration.

Je vous remercie pour l'accueil plein de compréhension que j'ai toujours trouvé auprès de vous.

Je vous prie d'accepter le témoignage de ma vive gratitude et de mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur Pierre JOLLES,

Directeur de Recherches au C.N.R.S.

Je vous remercie pour le grand honneur que vous m'avez fait en acceptant de parrainer mon travail de recherche.

Votre grande compétence dans le domaine de la structure des protéines et votre autorité scientifique me font solliciter toute votre indulgence pour juger ce travail.

Soyez assuré de ma respectueuse gratitude.

Mademoiselle le Docteur Madeleine CHAMPAGNE,

Maître de Recherches au C.N.R.S.

L'étendue de vos connaissances dans le domaine des histones et votre personnalité, associées à une grande simplicité et beaucoup de gentillesse, m'ont toujours impressionnée.

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je vous en suis profondément reconnaissante.

Monsieur le Professeur Maurice DURCHON,

Professeur de Zoologie Générale et Appliquée

J'ai eu le privilège de suivre avec beaucoup d'intérêt votre Enseignement au cours de mes études à la Faculté des Sciences.

Je vous remercie très vivement d'avoir accepté de juger ce travail, fruit d'une collaboration efficace et sympathique avec votre Equipe de Chercheurs.

Veillez accepter l'expression de ma profonde gratitude et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Pierre SAUTIERE,

Maître de Recherches au C.N.R.S.

Je suis très heureuse de vous compter aujourd'hui parmi mes Juges.

Dès mon entrée au Laboratoire, j'ai eu le privilège de travailler sous vos ordres et c'est vous qui m'avez appris, au jour le jour, avec beaucoup de patience et de bienveillance, la rigueur, la méthode, la précision et l'amour du travail bien fait. C'est grâce à vos conseils et à vos encouragements que j'ai pu mener à bien ce travail.

Je vous en remercie de tout coeur.

A Monsieur le Docteur Alain RICHARD,

C'est en partie grâce à vous que ce travail a pu être réalisé. Vous n'avez pas ménagé votre peine ni votre temps pour récolter le grand nombre d'Oursins nécessaire à ce travail.

J'ai toujours trouvé auprès de vous sympathie et bonne humeur et je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères.

A mes amis de l'Equipe des Histones,

pour l'amitié et la bonne entente dans laquelle nous travaillons, et en particulier à

Madame Denise BELAICHE, Madame Marie-Joëlle DUPIRE et Mademoiselle Annie HEMEZ,

avec tous mes remerciements pour l'aide précieuse et efficace qu'elles m'ont apportée.

A Madame Marie-Thérèse GARET,

avec mes remerciements pour les reproductions photographiques qui illustrent cette Thèse.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON,
CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY,
P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERRET, KOUGANOFF,
LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT,
MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU,
ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire

M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGHIN Paul	Mécanique

M.	BKUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCO Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
Mlle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme	EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie
M.	FORELICH Daniel	Chimie Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle	KOSMAN Yvette	Géométrie
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mlle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M.	MACKÉ Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
M.	MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M.	MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M.	NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	PARSY Fernand	Mécanique
M.	PECQUE Marcel	Chimie Physique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse

M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie
Mle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	STEEN Jean-Pierre	Informatique
M.	THERY Pierre	Electronique
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M.	TREANTON Jean-René	Sociologie
M.	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILLETTE Michel	Mécanique
M.	WALLART Francis	Chimie
M.	WERNIER Georges	Informatique
M.	WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme	ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA CHROMATINE.....</u>	1
I- Les protéines non histones.....	2
II- Les histones.....	4
III- Etude de l'organisation de la chromatine...	11
1) Etude des interactions histones-histones	11
2) Etude des interactions histones-DNA.....	13
3) Etude de la diffraction des rayons X....	13
4) Etude de la diffusion des neutrons.....	14
5) Digestion de la chromatine par les nu- cléases.....	14
6) Etude en microscopie électronique.....	16
7) Modèles de structure quaternaire de la chromatine.....	17
 <u>CHAPITRE I :</u>	
<u>LES HISTONES D'INVERTEBRES MARINS.....</u>	21
I- Etude des protéines nucléaires basiques du- rant l'embryogénèse des Echinodermes.....	26

II- Etude des protéines nucléaires basiques à travers l'évolution des espèces.....	31
A) Les protéines nucléaires des Mollusques..	31
B) Les protéines nucléaires des Echinodermes	33
1- Mise en évidence d'une nouvelle classe d'histones riches en lysine.....	33
2- Etudes structurales des histones d'Echinodermes.....	38

CHAPITRE II :

<u>ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES HISTONES DE GONADES D'OURSIN.....</u>	45
I- <u>Isolement des histones.....</u>	46
A) Isolement des noyaux.....	46
B) Isolement de la désoxyribonucléoprotéine (DNP).....	47
1- A partir des noyaux purifiés.....	47
2- A partir du tissu total.....	48
C) Extraction des histones.....	48
1- Extraction des histones totales.....	48
2- Extraction sélective des histones.....	49
D) Purification des différentes histones.....	52
1- Isolement de l'histone H4 à partir de la fraction F_{2a1}	52
2- Isolement de l'histone H2A à partir de la fraction F_{2a2}	53
3- Isolement des histones H1 et H2B à partir de la fraction $F_1 + F_{2b}$	57
4- Isolement de l'histone H3 à partir de la fraction F_{2a2}	63

II- Caractérisation des histones de gonade d'Oursin.....	67
A) Electrophorèse analytique en gel de polyacrylamide	67
1- Histone H1.....	67
2- Histone H2B.....	67
3- Histone H3.....	69
4- Histone H2A.....	69
5- Histone H4.....	69
B) Composition en acides aminés.....	70
1- Histone H1.....	70
2- Histone H2B.....	72
3- Histone H3.....	74
4- Histone H2A.....	74
5- Histone H4.....	77

CHAPITRE III :

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H4 ISOLEE DES GONADES DE L'OURSIN <i>PSAMMECHINUS MILIARIS</i>	79
---	----

I- Stratégie.....	80
II- Description des méthodes utilisées.....	82
A) Oxydation performique.....	82
B) Maléylation.....	82
C) Hydrolyse trypsique et démaléylation.....	83
D) Fractionnement de l'hydrolysate par chromatographie d'échanges d'ions.....	83
E) Contrôle d'homogénéité et purification des fractions peptidiques.....	84
1- Chromatographie.....	84
2- Electrophorèse.....	86
3- Révélation des électrochromatogrammes.....	86
4- Purification des fractions hétérogènes.....	86

F) Coupure des liaisons aspartyles par l'acide acétique 0,25N.....	86
G) Technique d'étude de la séquence des peptides.....	87
1- Composition en acides aminés.....	87
2- Détermination de l'acide aminé NH ₂ -terminal....	87
3- Détermination de la séquence NH ₂ -terminale.....	88
4- Détermination de la séquence COOH-terminale....	88
III- Résultats.....	90
A) Séparation et étude des peptides tryptiques solubles de l'histone H4 maléylée.....	90
B) Séparation et étude des peptides tryptiques de la fraction insoluble de l'hydrolysate tryptique de l'histone H4 maléylée.....	103
C) Séparation des fragments obtenus par hydrolyse partielle acide de l'histone H4 de gonade d'Oursin	110
D) Séquence en acides aminés de l'histone H4 de gonade d'Oursin.....	119

CHAPITRE IV :

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H2A ISOLEE DES GONADES DE L'OURSIN <i>PSAMMECHINUS MILIARIS</i>	124
I- Stratégie.....	125
II- Description des méthodes utilisées.....	127
A) Maléylation.....	127
B) Hydrolyses enzymatiques de la protéine.....	127
1- Hydrolyse tryptique et démaléylation.....	127
2- Hydrolyse par la chymotrypsine.....	127
3- Hydrolyse par la thermolysine.....	128
C) Fractionnement des hydrolysats et étude des fractions peptidiques.....	128

1- Fractionnement.....	128
2- Etude des fractions peptidiques.....	128
III- <u>Résultats</u>	130
A) Etude des peptides tryptiques solubles de la protéine maléylée.....	130
1- Fraction S-1.....	130
2- Fractions S-2 et S-3.....	130
3- Fraction S-4.....	132
B) Etude de la fraction insoluble en milieu HCl 0,01N de l'hydrolysate tryptique de l'histone H2A maléylée.....	143
Discussion.....	145
C) Etude des peptides chymotryptiques de la protéine maléylée.....	149
Discussion.....	160
D) Etude des peptides obtenus par hydrolyse de l'histone H2A avec la thermolysine.....	162
Discussion.....	185
E) Séquence complète de l'histone H2A de gonade d'Oursin.....	187
Discussion.....	190
 <u>CONCLUSION</u>	 194
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 201

CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA CHROMATINE

Le contrôle de l'activité génétique est la base de processus fondamentaux tels que la différenciation, le développement embryonnaire, l'action des hormones, et de processus anormaux tels que le cancer et les maladies métaboliques.

Il est maintenant bien établi que les gènes qui transmettent l'information héréditaire d'une génération à l'autre et qui dirigent la fonction de chaque cellule vivante sont formés de DNA.

Dans les cellules des Eucaryotes, le maintien de la structure du DNA et la régulation de l'activité des gènes à l'intérieur des chromosomes sont assurés par les protéines chromosomales, histones et protéines non histones, associées au DNA au sein d'un complexe appelé chromatine.

Dans la chromatine, le rapport histones/DNA est généralement voisin de 1 tandis que le rapport protéines non histones/DNA varie de 0,5 à 1,5 en fonction de l'espèce animale ou végétale et de la nature du tissu (les cellules du foie à haute activité métabolique en contiennent plus que les cellules du thymus).

I- LES PROTEINES NON HISTONES

Les connaissances actuelles sur les protéines non histones sont encore très sommaires, à cause de leur nombre élevé et des difficultés rencontrées lors de leur isolement.

Cette classe de protéines recouvre probablement mais pas uniquement la classe des protéines nucléaires acides, car on y trouve des enzymes et des protéines telles que la myosine, la tropomyosine, l'actine et la tubuline (DOUVAS et *al.*, 1975).

Ces protéines sont difficiles à isoler à cause de leur tendance à former des agrégats soit entre elles, soit avec les histones. En général, le complexe nucléoprotéique est dissocié par de fortes concentrations de NaCl (2 à 3M) et d'urée (5 à 7M). Après élimination du DNA par chromatographie sur hydroxylapatite ou par ultracentrifugation, la séparation des histones et des protéines non histones est achevée par chromatographie d'échanges d'ions sur Biorex 70 ou sur CM-cellulose (LEVY et *al.*, 1972; MACGILLIVRAY et *al.*, 1972; DOUVAS et *al.*, 1975; JOHNS et *al.*, 1975), ou encore par pré-extraction des histones par les acides minéraux dilués (ELGIN et BONNER, 1970).

Un certain nombre de caractéristiques les différencient nettement des histones:

a) D'abord, leur nombre est élevé.

Dans le foie de Rat, par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide, il a été observé 27 bandes (ELGIN et BONNER, 1972) dont 10 à 15 représentent environ 70 p.100 de la fraction totale.

ORRICK et *al.* (1973) et YEOMAN et *al.* (1973) ont pu dénombrer 96 fractions distinctes en électrophorèse bidi-

mensionnelle sur gel de polyacrylamide, soit à partir du foie de Rat, soit à partir de l'hépatome de Novikoff.

b) Ensuite, l'analyse globale des acides aminés révèle leur richesse en acide aspartique et en acide glutamique, ce qui explique qu'elles soient chargées négativement. En effet, le rapport acides aminés dicarboxyliques/acides aminés basiques varie entre 1,2 et 1,6.

A l'inverse des histones, elles renferment du tryptophane.

c) Leur masse moléculaire varie de 10.000 à 150.000 daltons.

d) Elles renferment une certaine spécificité selon le tissu et l'espèce, mais la plupart des fractions majeures sont observées dans tous les tissus d'un même organisme.

Les protéines non histones peuvent être réparties en 4 classes (A,B,C et D) en fonction de leur caractère plus ou moins acide, de leur point isoélectrique, de leur poids moléculaire et de leur taux de lysine. La classe D, comprenant les plus riches en lysine, présente un intérêt particulier.

Deux protéines non histones de la classe D ont été récemment isolées et bien caractérisées (GOODWIN et *al.*, 1973; JOHNS et *al.*, 1975; WALKER et *al.*, 1976). Elles contiennent 25 p.100 de résidus basiques comme les histones, mais également 30 p.100 de résidus acides.

La séquence NH₂-terminale (24 résidus) de l'une d'entre elles a même été établie (JOHNS, 1975) et montre la présence de 9 résidus basiques. Les auteurs y voient une analogie certaine avec les histones, parce que les acides aminés basiques semblent distribués de façon irrégulière le long de la chaîne peptidique. Ils pensent que ces protéines, comme les histones, interviendraient plutôt dans le contrôle de la structure du DNA que dans celui de l'activité des gènes.

D'ailleurs, par étude en résonance magnétique nucléaire, CARY et *al.* (1976), ont démontré que la région riche en lysine de la protéine et qui semble contenir la plupart des résidus aromatiques, est liée au DNA tandis qu'une autre région plus acide de la chaîne peptidique reste libre.

II- LES HISTONES

Les histones sont des protéines basiques qui ont été découvertes, il y a cent ans environ, par KOSSEL, dans les noyaux d'érythrocytes d'oiseaux. Depuis, elles ont été retrouvées, associées au DNA, dans le noyau cellulaire de la plupart des organismes eucaryotes.

Chez les Procaryotes, où le matériel génétique est réparti d'une manière diffuse dans ce qu'il est convenu d'appeler le chromoïde, on n'a pas retrouvé d'histones. Néanmoins, SEARCY (1975) dans *Thermoplasma acidophilum* et ROUVIERE-YANIV et GROS (1975) dans *Escherichia coli* ont identifié une protéine "histone-like" associée au DNA, qui présente un caractère basique et a une masse moléculaire voisine de 10.000 daltons.

La plupart des tissus des Eucaryotes renferment 5 types d'histones: H1, H2A, H2B, H3 et H4. Les érythrocytes nucléés des oiseaux, poissons, reptiles et batraciens renferment en outre une histone spécifique H5.

La structure primaire des histones H2A, H2B, H3 et H4 du thymus de Veau est maintenant connue: DELANGE et *al.* (1969a), OGAWA et *al.* (1969), IWAI et *al.* (1970), SAUTIERE et *al.* (1972), YEOMAN et *al.* (1972), DELANGE et *al.* (1973), SAUTIERE et *al.* (1974).

La séquence complète d'une histone H1, isolée du thymus de Lapin RTL3 (R. D. COLE, communication personnelle) a été très récemment déterminée.

De l'histone H5 d'érythrocytes de Poulet, on ne connaît que la séquence des 111 premiers résidus (SAUTIERE et al., 1976), et des séquences partielles dans la moitié COOH-terminale.

Les caractéristiques de chacune de ces histones sont maintenant bien connues et sont rassemblées dans le tableau I. L'étude des séquences en acides aminés a permis de mettre en évidence d'autres caractéristiques d'ordre structural.

a) La répartition des résidus basiques est asymétrique dans la chaîne peptidique. Ils sont souvent associés en doublets, en triplets ou forment parfois des centres basiques dans la partie NH₂-terminale pour les histones H2A, H2B, H3 et H4. La partie COOH-terminale de ces protéines présente un caractère hydrophobe dû à l'abondance de résidus apolaires qui favoriseraient la formation d'hélice α dans cette partie de la molécule.

Une répartition inverse prévaut dans les histones de type H1 et H5 où la plupart des résidus basiques sont accumulés dans la moitié COOH-terminale de la protéine (50 p.100 des résidus).

Les régions basiques sont évidemment le siège privilégié des liaisons électrostatiques avec les groupes phosphate du DNA, tandis que les régions hydrophobes ont des caractères structuraux qui permettent aux histones d'interagir entre elles ou avec les protéines non histones.

b) Les histones sont parmi les protéines les plus fortement modifiées: ces modifications post-synthétiques incluent l'acétylation, la méthylation (particulièrement pour les histones H3 et H4), et la phosphorylation (essentiellement pour les histones H1).

L'acétylation des histones est en rapport avec le taux de synthèse du RNA. La phosphorylation des histones est en rapport avec le taux de division cellulaire. De telles réactions peuvent être importantes dans le contrôle de l'activité et de la structure générale du génome.

A l'exception de H1 et H5, les histones en solution s'auto-associent pour former des structures de haut poids moléculaire, sous l'effet d'une augmentation de la force ionique, du pH, de la température ou de la concentration en protéine.

* Adoptée lors du récent Symposium de la Ciba Foundation sur " La structure et la fonction de la chromatine ", Londres, avril 1974.

** D'après la valeur de ce rapport $\text{Lys/Arg} > 1$, ces 3 histones sont appelées " riches en lysine ", les 3 autres étant des histones " riches en arginine ".

c) Les histones H2A, H3 et H5 présentent à l'intérieur d'une même espèce un certain polymorphisme. Les microhétérogénéités qui sont actuellement connues sont rassemblées dans le tableau II.

d) Les histones H3 et H4 montrent cependant une remarquable conservation de leur séquence en acides aminés à travers l'évolution des espèces. Le taux de mutation de l'histone H4 est de 0,06 résidu pour 100 résidus d'acides aminés et pour 10^8 années.

La structure primaire de l'histone H4, déterminée chez le Pois et le Veau (DELANGE et *al.*, 1969b; DELANGE et *al.*, 1969a) ne montre que 2 mutations conservatives: le résidu d'isoleucine en position 60 est remplacé par un résidu de valine et le résidu d'arginine en position 77 est remplacé par un résidu de lysine.

La structure primaire de l'histone H3, déterminée chez le Pois (PATTY et *al.*, 1973) et le Veau (DELANGE et *al.*, 1973) ne montre que 4 mutations: le résidu de phénylalanine en position 41 est remplacé par un résidu de tyrosine; le résidu de lysine en position 53 est remplacé par un résidu d'arginine; le résidu de sérine en position 90 est remplacé par un résidu de méthionine; et le résidu d'alanine (60 p.100) ou de sérine (40 p.100) en position 96 est remplacé par un résidu de cystéine.

Ce caractère hautement conservatif semble indiquer que l'intégrité de leur structure primaire est nécessaire à leur fonction biologique.

Les histones H2A et H2B ont une séquence plus variable (BAILEY et DIXON, 1973; STRICKLAND et *al.*, 1974; LAINE et *al.*, 1976; KOOTSTRA et BAILEY, 1976). Leur taux de mutation est identique: 0,16 résidu pour 100 résidus d'acides aminés et pour 10^7 années. Les mutations sont localisées dans les parties NH₂ et COOH-terminales de la protéine et très rarement dans la partie hydrophobe.

TABLEAU II

MICROHETEROGENEITES DANS LES HISTONES H3, H2A ET H5

Histone	Espèce	Position de l'acide aminé	Acides aminés	Références
H3	Pois	96	Alanine ou Sérine	PATTHY et <i>al.</i> (1973)
H3	Veau	96	Cystéine ou Sérine	MARZLUFF et <i>al.</i> (1972) PATTHY et <i>al.</i> (1973)
H2A	Rat	16	Sérine ou Thréonine	LAINE et <i>al.</i> (1976)
H2A	Rat Veau	99	Arginine ou Lysine	LAINE et <i>al.</i> (1976)
H5	Poulet	15	Arginine ou Glutamine	GREENAWAY et MURRAY (1971)



L'histone H1 est la moins conservative à la fois en ce qui concerne le nombre de sous-fractions présentes dans un tissu et une espèce donnés et l'évolution de cette protéine. En effet, il a été observé 1 à 8 sous-fractions d'histone H1 dans des espèces variées. A l'intérieur d'une même espèce, les proportions relatives des différentes sous-fractions varient selon les tissus. Les différentes sous-fractions coexistant dans un même organisme peuvent avoir jusque 15 p.100 des résidus substitués. La comparaison faite entre le Lapin (R. D. COLE, 1976, communication personnelle) et la Truite (DIXON, communication personnelle) suggère une variation de 15 à 28 p.100 des résidus entre 2 organismes d'espèces différentes.

Dans les 2 cas, les substitutions qui interviennent ne sont pas conservatives. De plus, on rencontre une hétérogénéité considérable dans la taille de cette histone (SUBIRANA et *al.*, 1970; PANYIM et *al.*, 1971; SHEROD et *al.*, 1974).

Le tableau III présente les caractéristiques principales de l'histone H1 par comparaison avec celles des autres histones.

La connaissance de la structure primaire des histones est une étape importante dans l'étude de l'organisation de la chromatine, dont nous allons présenter les concepts actuels.

TABLEAU III

COMPARAISON DES HISTONES H1 AUX AUTRES CLASSES D'HISTONES
(d'après R. D. COLE, communication personnelle)

Caractéristiques	Histone H1	Histones H2A, H2B, H3 et H4
Diversité	Habituellement 4 à 5 types moléculaires	<u>Un</u> type moléculaire dans chaque classe
Poids moléculaire	21.000	11.000 - 15.000
Stoichiométrie	1 molécule par 200 paires de bases	2 molécules de chaque classe par 200 paires de bases
Séquence en acides aminés	Variable	Presque invariable
Répartition des acides aminés	Cationique-Hydrophobe-Cationique	Cationique-Hydrophobe



III- ETUDE DE L'ORGANISATION DE LA CHROMATINE

L'étude de l'organisation de la chromatine est surtout limitée actuellement à l'étude des interactions DNA-histones et histones-histones, à cause des connaissances limitées que nous possédons sur les protéines non histones.

Elle met en oeuvre des méthodes physiques, telles que le dichroïsme circulaire, la RMN, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu SDS, auxquelles viennent s'associer la diffraction des rayons X et la diffusion des neutrons, l'action des nucléases sur la chromatine et la microscopie électronique.

1) Etude des interactions histones-histones

a- Entre histones de même nature

A l'aide de la RMN, du dichroïsme circulaire et de la spectroscopie UV, LEWIS et *al.*, 1975, ont étudié le repliement et l'autoassociation induits par les sels dans le cas de l'histone H4. Ils ont également étudié le comportement de gros fragments d'histone H4 obtenus par coupure des liaisons aspartyles avec l'acide acétique 0,25N.

En milieu de force ionique 0,1-0,2, l'histone H4 subit des changements structuraux qui impliquent la formation d'hélice α et conduisent à l'obtention d'agrégats de poids moléculaires élevés. Le fragment 25-67 de l'histone H4 a un comportement identique à celui de l'histone entière. Les autres fragments (1-24, 69-85, 86-102) n'interagissent pas.

Les auteurs concluent que le fragment 25-67 est impliqué dans le repliement et l'autoassociation de l'histone H4.

b- Entre histones différentes

KORNBERG et THOMAS (1974) ont extrait les histones par des méthodes douces: extraction saline selon VAN DER WESTHUYZEN et VON HOLT (1971). Ils ont fractionné les histones en 3 groupes: histone H1, histones H2A et H2B, histones H3 et H4.

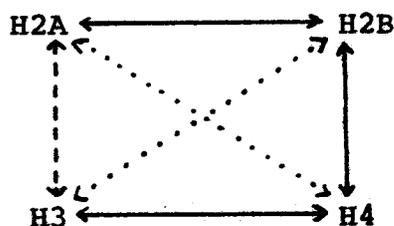
Après pontage de ces paires d'histones avec le diméthylsuberimide, ils ont montré l'existence d'un tétramère (H3₂, H4₂) et d'oligomères (H2A, H2B).

ROARK et al. (1974) ont étudié le complexe (H3, H4) par ultracentrifugation. Ils ont démontré qu'il existait un équilibre entre le tétramère (H3₂, H4₂) et le dimère (H3, H4) selon la concentration du milieu.

SKANDRANI et al. (1972) ont mis en évidence un complexe (H2A, H2B) par chromatographie de la fraction F_{2b} de JOHNS (1964) sur résine Amberlite IRC-50.

KELLEY (1973) a observé également un complexe (H2A, H2B) qu'il a identifié comme étant un hétérodimère.

D'ANNA et ISEBERG (1974) ont étudié les interactions entre histones par anisotropie de fluorescence, dichroïsme circulaire et diffusion de la lumière. Ils ont trouvé que les paires d'histones H3-H4, H2A-H2B et H2B-H4 forment des complexes solides. Dans les 3 cas, il y a augmentation de l'hélice α . Les complexes H2A-H3 sont plus faibles tandis que les complexes H2A-H4 et H2B-H3 sont très faibles. Ceci est représenté dans le schéma suivant: (D'ANNA et ISEBERG, 1974).



Complexe fort —————
 Complexe faible - - - - -
 Complexe très faible

En fait, il est généralement admis que ces 4 histones forment une unité interagissante.

2) Etude des interactions histones-DNA

BRADBURY et *al.* (1973) ont montré par résonnance magnétique nucléaire que les histones interagissent avec le DNA par leurs régions polaires (région 1 à 31 pour les histones H4 et H2B, région 1 à 25 pour l'histone H2A).

GOUREVITCH et *al.* (1974) ont fait ressortir le rôle des multipléts basiques que l'on retrouve dans ces régions NH₂-terminales des histones.

3) Etude de la diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X par la chromatine fait apparaître une série régulière de bandes de diffraction. Pour expliquer ce phénomène, WILKINS a proposé en 1964 un modèle dans lequel les histones s'enroulent autour du DNA en une superhélice régulière de diamètre 100 Å et de 120 Å de pas. L'unité de répétition qui provoquerait des bandes de diffraction régulières serait le pas de l'hélice.

Ce modèle a été généralement accepté pendant 10 ans. En 1970, les observations de RICHARDS et PARDON sont venues appuyer cette hypothèse: ils arguaient de la présence d'un anneau de diffraction à 100-110 Å que le noyau contiendrait un complexe d'histones et de DNA dont la structure serait formée d'unités de répétition de 100 Å.

Toutefois, la superhélice décrite par WILKINS ne serait pas la seule interprétation valable des données obtenues par les rayons X (PARDON et WILKINS, 1972). Il pourrait exister d'autres modèles faits d'enroulements et de repliements du DNA répétés à intervalles réguliers de 100 Å.

KORNBERG (1974), se basant sur les spectres de diffraction des rayons X et sur l'étude des complexes d'histones, proposa un modèle de la sous-unité de la chromatine:

une structure globulaire interne formée par le tétramère (H3₂, H4₂) et 2 molécules de chacune des histones H2A et H2B, entourée d'une portion de DNA d'environ 200 paires de bases. H1 n'intervient pas dans cette sous-unité.

Pour vérifier cette hypothèse, THOMAS et KORNBERG (1975) ont réalisé une série d'expériences de pontage par le diméthylsuberimide. Ils en concluent qu'il y a de fortes associations entre les octamères, mais qu'elles sont plus faibles que les associations intra-octamères. Les histones seraient organisées dans la chromatine selon le modèle présenté dans la figure 1.

4) Etude de la diffusion des neutrons

BALDWIN et *al.* (1975) sont arrivés à la même conclusion en étudiant la diffusion des neutrons par la chromatine. Les résultats qu'ils ont obtenus leur ont permis de proposer un modèle où les unités de base seraient formées par les 4 histones H2A, H2B, H3 et H4 interagissant entre elles par leurs régions apolaires pour former un core central autour duquel s'enroulerait le DNA; le DNA est lui-même complexé avec les segments basiques des histones situés sur le pourtour du core central apolaire (figure 2).

Il y aurait 1,5 à 2 tours de DNA par particule (diamètre de la spire: 100 Å). L'histone H1 pourrait avoir un rôle de lien entre les particules d'une même chaîne ou de 2 chaînes différentes.

5) Digestion de la chromatine par les nucléases

HEWISH et BURGOYNE (1973) ont étudié la digestion de la chromatine de foie de Rat par des endonucléases. Les produits obtenus par cette digestion forment une suite régulière de poids moléculaires croissants, les plus gros étant des multiples entiers des plus petits. Ils en ont déduit que les sous-unités de base de la chromatine seraient séparées par des sites accessibles aux endonucléases espacés régulièrement.

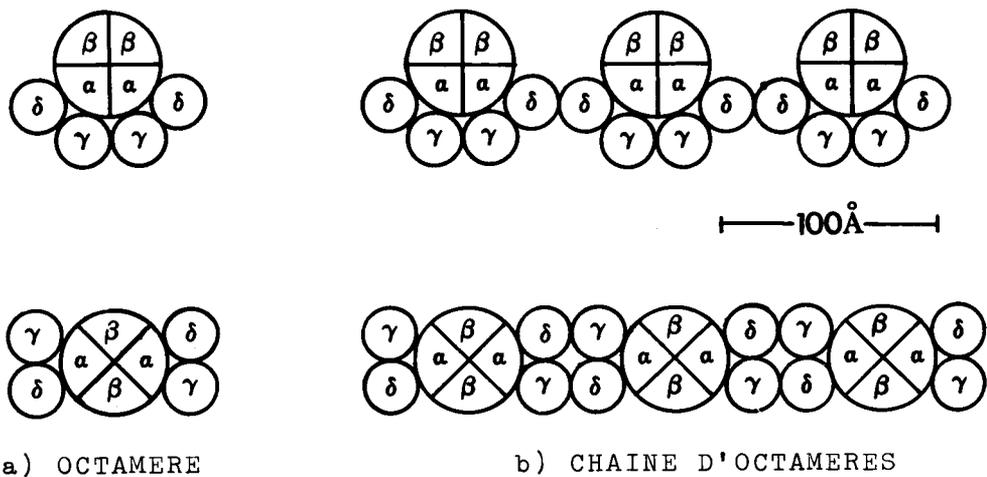


Fig.1. Organisation des histones dans la chromatine selon THOMAS.O.J. et KORNBERG.R.D. (1975) Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 72, 2626-2630.

a) à l'intérieur de l'octamère.

b) en chaînes d'octamères

α , β , γ et δ représentent respectivement H₄, H₃, H_{2A} et H_{2B}.

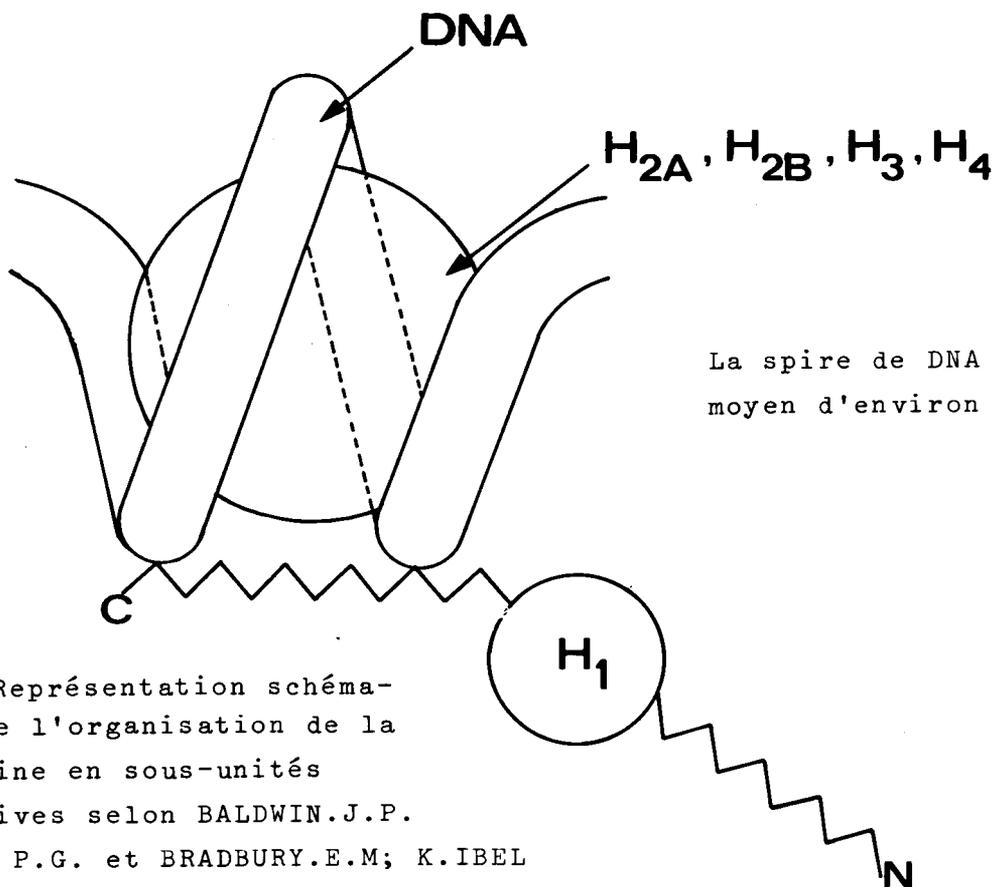


Fig.2. Représentation schématique de l'organisation de la chromatine en sous-unités répétitives selon BALDWIN.J.P. BOSELEY P.G. et BRADBURY.E.M; K.IBEL Nature 253, 245-249.



OUDET et *al.* (1975) ont utilisé la chromatine d'érythrocytes de Poulet débarrassée de H1 et H5. Ils ont observé des particules de $128 \pm 12 \text{ \AA}$ de diamètre qu'ils appellent nucléosomes. Le filament reliant les nucléosomes a une longueur variable (130 à 260 \AA). Il disparaît si la chromatine est traitée par la nucléase micrococcale (SAHASRABUDDHE et VAN HOLDE, 1974; WOODCOCK et *al.*, 1976).

Certains, dont NOLL, THOMAS et KORNBERG (1975) ont pensé que dans la structure native de la chromatine, les unités seraient jointives et qu'en fait, ce serait le traitement préparatif, physique ou chimique, qui provoquerait un déroulement plus ou moins important des globules fondamentaux. Des modèles plus compacts ont ainsi vu le jour.

7) Modèles de structure quaternaire de la chromatine

Sur la base des données de la diffraction des rayons X, BRAM (1975) a proposé un modèle où les unités seraient disposées de façon jointive (figure 3) en une fibre de diamètre 100 \AA qui formerait elle-même une superhélice de diamètre 250 \AA avec un pas de 400 à 500 \AA . Chaque unité serait formée d'un octamère d'histones entouré d'une hélice de DNA de pas 50 \AA .

BRAM a également suggéré que la présence de Ca^{2+} dans les chromosomes provoquerait une supercontraction de la superhélice en ramenant le pas à 250 \AA .

FINCH (1975) a récemment observé au microscope électronique des globules de diamètre 100 \AA et à peu près jointifs, qui peuvent être isolés par l'action limitée de nucléases. Leur masse moléculaire est environ 240.000, ce qui peut correspondre à un octamère d'histones (110.000) associé à 150-200 paires de bases de DNA (130.000).

BRAM (1975), utilisant une technique particulière de préparation par congélation brusque a pu observer directement au microscope électronique la superhélice. Il pense que le DNA formerait 1 ou 2 tours autour de l'octamère

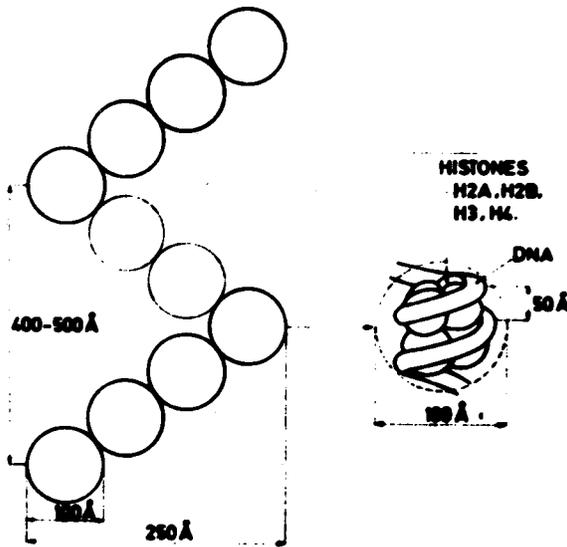


FIGURE 3

Modèle de structure de la chromatine en superhélice de BRAM et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1043-1045, 1975)

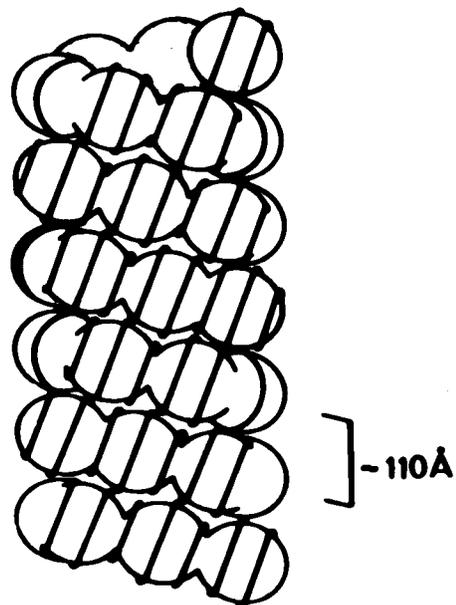
Les unités globulaires jointives forment la structure quaternaire. L'une d'entre elles est détaillée à droite, montrant l'octamère d'histones entouré par une superhélice de DNA.

FIGURE 4

Diagramme schématique montrant la disposition du nucléofilament en un solénoïde.

La ligne fine enroulée en hélice le long du nucléofilament représente la double hélice de DNA entourant le core protéinique.

D'après FINCH et KLUG (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1897-1901, 1976)



d'histone, et qu'un second segment de DNA entourerait un ensemble de 2 unités. Ce segment serait peut-être celui qu'on distingue lors de l'extension ou de la dégradation de la structure native.

FINCH et KLUG (1976) ont préparé une chromatine "native" par digestion brève du noyau par la nucléase micrococcale. Ils observent alors au microscope électronique une superhélice plus compacte encore que celle de BRAM et qu'ils appellent solénoïde. Le pas du solénoïde serait 110 \AA et ce serait lui qui donnerait les bandes de diffraction à 110 \AA (figure 4). Cette interprétation a été vérifiée par des photographies aux rayons X de culots de centrifugation contenant des structures solénoïdales.

Il y aurait environ 4 à 10 nucléosomes par spire du solénoïde mais le cas le plus fréquent serait 6 ou 7, donnant un diamètre total d'environ 300 \AA . Au centre du solénoïde, subsisterait une lumière d'environ 100 \AA de diamètre. Elle pourrait éventuellement être occupée dans les chromosomes, non seulement par l'histone H1 et les protéines non histones, mais aussi comme l'a suggéré F. H. C. CRICK, par du DNA nu, comme il semble en exister dans les chromosomes après élimination de H1.

Si donc les histones H2A, H2B, H3 et H4 interviennent directement pour maintenir la structure du DNA, quel est le rôle particulier de H1 ?

Selon BRAM (1975), elle ferait peut-être le lien entre 2 unités ou avec les protéines non histones. Elle interviendrait donc pour former des structures d'ordre supérieur dans les chromosomes.

D'après COLE (communication personnelle), les histones H1 pourraient s'unir aux protéines non histones (ou "hertones") pour former un "her body", tandis que les 4 histones H2A, H2B, H3 et H4 formeraient un "his body". L'union d'un "his body" et d'un "her body" formerait ce qu'OLINS appelle un "v body".

Les "her bodies" seraient de caractères divers parce qu'ils contiennent différentes sous-fractions de H1 et aussi différentes protéines non histones. Les "her bodies" donneraient donc aux "v bodies" leur diversité fonctionnelle.

CHAPITRE I

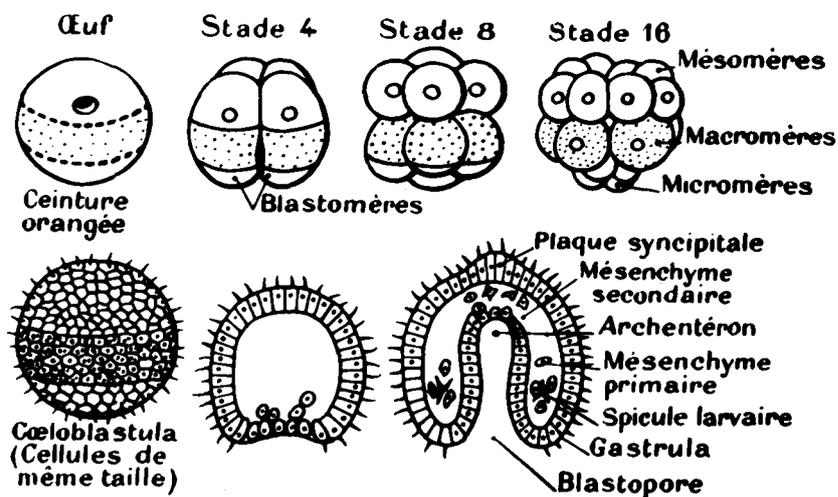
LES HISTONES D'INVERTEBRES MARINS

La différenciation cellulaire est déterminée par activation ou inactivation sélective de gènes individuels. Pendant le développement de l'embryon, la différenciation cellulaire est très élevée et l'on peut observer une augmentation considérable de l'activité génétique de la chromatine qui se manifeste par une synthèse accrue de RNA.

Les protéines chromosomales qui contrôlent d'une part le maintien de la structure du DNA et d'autre part l'activité des gènes à l'intérieur des chromosomes, doivent avoir un rôle fondamental dans la différenciation cellulaire et l'on peut se demander si elles varient beaucoup au cours du développement embryonnaire.

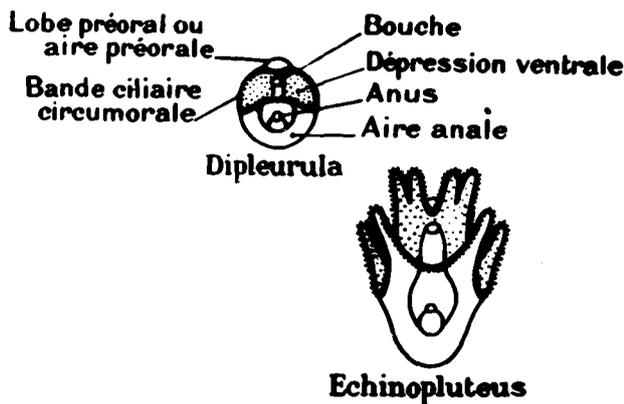
Les Echinodermes sont un matériel de choix pour les expériences d'embryogénèse. En effet, le développement de l'oeuf a été parfaitement étudié jusqu'au stade adulte (figure 5) et il est relativement facile d'obtenir des embryons à des stades précis de développement.

Aussi, il est aisé de comprendre pourquoi de nombreux chercheurs se sont intéressés à cette classe d'Invertébrés marins. D'autre part, si l'on considère l'arbre phylogénétique du règne animal d'après L. CUENOT (figure 6), les Echinodermes se placent dans la branche gauche qui donne naissance au groupe des Vertébrés. Ils occupent là une position tout à fait particulière par rapport à la grande majorité des Invertébrés - Vers, Mollusques et Arthropodes - qui occupent la branche droite de l'arbre phylogénétique.



Les premiers stades du développement chez *Paracentrotus lividus*.

L'oeuf est en général petit (0,1 à 0,2 mm de diamètre) et pauvre en vitellus. La segmentation est totale et radiaire. Elle aboutit à une coeloblastula. Par invagination, la coeloblastula se transforme en gastrula.



La gastrula devient, après la métamorphose du coelome, une larve pélagique à symétrie bilatérale, la larve Dipleurula, qui deviendra à son tour la larve Pluteus.

FIGURE 5

Etapes du développement embryonnaire de l'Oursin



Par leur caractère très primitif et leur position éloignée de celle des Mammifères, les Echinodermes constituent donc un matériel de choix pour l'étude des histones.

Chez les Insectes, l'étude des protéines nucléaires durant l'embryogénèse paraît aussi extrêmement intéressante, à cause des transformations énormes que provoque la métamorphose. D'ailleurs, de nombreuses équipes ont déjà isolé les protéines nucléaires d'Insectes et des études comparatives entre les protéines nucléaires d'embryons de *Drosophile* (OLIVER et CHALKLEY, 1972; ALFAGEME et *al.*, 1974) et de *Drosophile* adulte (DICK et JOHNS, 1969; COHEN et GOTCHEL, 1971; OLIVER *et al.*, 1972) ont été réalisées. Ces études montrent qu'il n'existe que des différences mineures dans l'analyse quantitative de ces histones. Le trait le plus caractéristique des histones larvaires est la présence d'une protéine basique spécifique migrant un peu plus vite que H1 en gel de polyacrylamide.

Nous limiterons toutefois notre étude aux protéines nucléaires basiques isolées chez les Invertébrés marins et nous ferons le point des recherches dans ce domaine au moment où nous avons entrepris l'étude des histones d'Echinodermes.

L'étude des protéines nucléaires d'Echinodermes présente donc un double intérêt. Elle permet :

a) de suivre l'évolution des protéines nucléaires durant le développement de l'embryon.

b) de suivre l'évolution de ces protéines à travers l'évolution des espèces, par comparaison avec les protéines analogues de Mammifères.

I- ETUDE DES PROTEINES NUCLEAIRES BASIQUES
DURANT L'EMBRYOGENESE DES ECHINODERMES

GLISIN et *al.* (1966) ont démontré qu'environ 40 p.100 des molécules de RNA messenger varient pendant le processus de la gastrulation. C'est à cette période du développement embryonnaire de l'Oursin que VOROBYEV (1969) a constaté les plus grandes variations dans la composition des protéines nucléaires. Il a isolé les histones d'embryons à différents stades de développement et particulièrement au stade blastula (24h et 36h de développement) et au stade gastrula (56h et 74h de développement). Par étude en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, il a pu constater une certaine évolution qui se manifeste par une disparition presque totale des fractions riches en arginine et par une augmentation des fractions riches en lysine.

BONNER et *al.* (1968), ayant démontré que les proportions et les types de molécules de RNA synthétisées "in vitro" dépendaient de la présence de protéines basiques et acides, HNILICA et JOHNSON (1970) ont pensé que l'analyse de ces protéines chez l'embryon en cours de développement pouvait aider à éclairer leur rôle dans la différenciation cellulaire.

Ils ont donc fractionné et analysé les protéines nucléaires de l'embryon de l'Oursin *Strongylocentrotus purpuratus*. La composition en acides aminés de ces protéines a été déterminée à différents stades de développement, de l'oeuf non fécondé à la larve Pluteus. Les protéines acido-solubles qu'ils ont isolées montrent une augmentation des taux d'arginine et de lysine pendant le développement, la plus grande différence se situant entre l'oeuf non fécondé et le stade gastrula. Après la gastrulation, la composition de ces protéines varie très peu.

En gel de polyacrylamide, ils ont obtenu des diagrammes de séparation électrophorétique identiques pour les protéines nucléaires d'embryons au stade post-blastula et pour les protéines nucléaires d'intestin d'Oursin adulte. De plus, cette séparation est aussi comparable à celle obtenue pour les protéines nucléaires d'hépatome de Novikoff (histones de Vertébrés).

D'autre part, les histones riches en arginine du sperme d'Oursin sont identiques à celles trouvées chez l'embryon (VOROBYEV avait noté une disparition presque totale des fractions riches en arginine entre le stade blastula et le stade gastrula). Par contre, les histones riches en lysine montrent des diagrammes de séparation différents sur gel de polyacrylamide. Cette variation peut être due à une modification de ces histones: phosphorylation, acétylation ou encore à la présence d'histones spécifiques dans le sperme.

Les auteurs concluent qu'il n'est pas possible de détecter des protéines semblables aux histones avant le stade blastula. Par contre, après ce stade, des histones typiques apparaissent. Après le stade gastrula, elles semblent se stabiliser puisqu'on les retrouve non modifiées chez l'adulte.

Par observation directe en autoradiographie de l'incorporation de précurseurs marqués dans le DNA associé aux protéines, KEDES et *al.* (1969) ont démontré que des protéines acido-solubles étaient synthétisées dans le cytoplasme de l'embryon aux tout premiers stades et qu'elles étaient rapidement transférées dans le noyau. Malheureusement, ces protéines n'ont jamais pu être identifiées comme étant réellement des histones.

Il est donc possible que dans les premiers stades du développement de l'embryon de l'Oursin, les histones soient remplacées par d'autres protéines acido-solubles (HNILICA et JOHNS N, 1970).

Un résultat contraire a été obtenu par EVANS et OZAKI (1973). Dans les oeufs non fécondés, ils ont caractérisé par leur solubilité et leur mobilité électrophorétique des protéines nucléaires basiques qu'ils ont assimilées à des histones: 4 fractions ont pu être obtenues.

- l'une de faible mobilité électrophorétique, ne correspond pas à l'histone H1 ni au dimère H3. Elle pourrait cependant correspondre à un complexe de H3 et d'une autre protéine soufrée.

- deux autres fractions de migrations moyennes pourraient correspondre aux histones H2A et H2B.

- enfin, une quatrième fraction de migration rapide pourrait correspondre à l'histone H4.

Toutefois, le seul critère électrophorétique ne paraît pas suffisant pour identifier une histone.

BENTTINEN et COMB (1971) ont distingué 2 périodes dans le développement embryonnaire de l'Oursin: les premiers stades où les mitoses sont très fréquentes (à peu près 1 mitose par heure) et les stades plus tardifs où les divisions cellulaires sont plus lentes.

Dans les premiers stades (32 cellules), ils remarquent que la fraction de type H2B est prépondérante.

Dans les stades plus évolués (gastrula), il y a augmentation considérable des histones de type H1 et H3. De plus, les fractions correspondant à H2A et H4 se dédoublent. Ils assimilent la deuxième bande de H4 soit à une nouvelle histone, soit à une modification telle que l'acétylation ou la méthylation de cette protéine.

L'acétylation de l'histone H4 a déjà été réalisée "in vitro" par VIDALI et *al.* (1968) et la séparation des formes acétylée et non acétylée a été mise en évidence par PANYIM et CHALKLEY (1969). Il est donc possible que ce soit cette modification qui intervienne durant l'embryogénèse de l'Oursin.

Cette hypothèse a d'ailleurs été vérifiée par JOHNSON et *al.* (1973a) qui ont suivi l'acétylation des protéines nucléaires durant le développement embryonnaire de l'Oursin (du stade 32 cellules au stade Pluteus) par la mesure de l'incorporation d'acétate marqué au ^{14}C .

- Ils ont remarqué qu'au stade 32 à 64 cellules, il existe de nombreuses protéines acido-solubles de faible migration électrophorétique qu'on ne retrouve plus au stade gastrula. Cependant, il existe des histones semblables à celles retrouvées dans les stades plus évolués. La fraction majeure est celle qui migre au niveau de H1. L'incorporation d'acétate est encore très minime à ce stade, mais on peut déjà remarquer des pics bien définis au niveau des histones H3, H2B-H2A et H4 (cette dernière semble la plus "marquée").

- Du début de la blastulation au stade Pluteus, ils ont mis en évidence:

= une augmentation considérable de la proportion de H1 par rapport aux autres histones.

= la polymérisation complète de H3 aux stades blastula et gastrula.

= la faible acétylation de H1 à tous les stades du développement. Cette acétylation semble représenter la N-acétylation du groupe NH_2 -terminal.

= la forte acétylation de H3 à tous les stades du développement

= dans les premiers stades, les histones H2A, H2B et H4 sont aussi acétylées, la H4 montrant une acétylation variable selon les stades: très importante chez la blastula et la gastrula, elle semble ensuite décroître mais une recrudescence de l'acétylation se manifeste au stade Pluteus.

Les auteurs en déduisent que les histones des embryons d'Oursin sont acétylés de la même manière que les histones des Mammifères. Il apparaît donc que cette modification biochimique est un mécanisme évolutif probablement lié à la fonction du chromosome.

Enfin, JOHNSON et *al.* (1973b) ont isolé par électrophorèse préparative et caractérisé 4 des 5 histones présentes dans la larve *Pluteus* de l'Oursin *Strongylocentrotus purpuratus*. La composition en acides aminés de ces histones d'embryons est semblable à celle des histones correspondantes du thymus de Veau, à l'exception de l'histone très riche en lysine H1.

Deux histones riches en lysine sont observées dans la larve *Pluteus*: toutes deux contiennent plus d'acide glutamique que l'histone H1 de thymus de Veau. L'une d'entre elles n'est pas soluble dans l'acide perchlorique à 5 p.100 et est extraite avec l'histone H2B. Des histones riches en lysine, de composition similaire, avaient déjà été caractérisées par SUBIRANA et *al.* (1970) chez l'embryon de l'Oursin *Arbacia lixula*.

Il semblerait donc, d'après l'ensemble de ces travaux, que les histones isolées à différents stades du développement embryonnaire de l'Oursin soient peu différentes de celles obtenues chez les animaux supérieurs, ce qui montre une considérable conservation phylogénétique de ces protéines. Elles existent déjà dans l'oeuf non fécondé mais montrent toutefois quelques variations pendant l'embryogénèse, jusqu'au stade de gastrulation. Passé ce stade, elles ne varient pratiquement plus.

II- ETUDE DES PROTEINES NUCLEAIRES BASIQUES A TRAVERS L'EVOLUTION DES ESPECES

Déjà, en 1955, HAMER décrit, dans le sperme des Echinodermes, des protéines nucléaires basiques qu'il appelle "histone-like", leur composition chimique étant analogue à celle des histones de thymus de Veau. Par contre, il trouve chez les Mollusques des protéines qui semblent intermédiaires entre les histones et les protamines, les protamines étant des protéines de petite taille qui contiennent un taux très élevé d'arginine et qu'on trouve dans le sperme des poissons.

Cette première observation permet de mettre en évidence une certaine divergence entre les Echinodermes et les Mollusques, divergence qui sera vérifiée par la suite. C'est pourquoi nous nous permettrons de séparer ces 2 embranchements dans notre étude.

A) LES PROTEINES NUCLEAIRES DES MOLLUSQUES

C'est COZCOLLUELA et SUBIRANA (1968) qui ont isolé les premiers les histones H1, H2A, H2B et H3 de l'hépatopancreas de la Moule *Mytilus edulis*. Ces histones, extraites d'un tissu somatique, paraissaient très semblables aux histones analogues isolées du thymus de Veau. Seules, les fractions riches en lysine H1 et H2B étaient caractérisées par un taux plus élevé d'arginine et d'acides aminés dicarboxyliques, et un taux plus faible de lysine.

SUBIRANA et *al.* (1973) se sont donc intéressés tout particulièrement aux protéines très basiques isolées du spermatozoïde de différentes espèces de Mollusques. La composition en acides aminés, de même que la mobilité électrophorétique varient considérablement selon les espèces. Dans certains cas (dont la Pieuvre, le Calmar), les protéines majeures sont semblables aux protamines, bien qu'elles aient

une masse moléculaire plus importante. Dans d'autres cas (la Moule, le Chiton), ils trouvent un mélange de protéines intermédiaires entre les protamines et les histones. Enfin, un troisième groupe de Mollusques (dont l'Huître et la Patelle) contient des protéines dont la composition semble intermédiaire entre les protamines et les histones, mais dont la masse moléculaire semble plus importante que celle des histones.

PHELAN et *al.* (1974) ont isolé une histone riche en lysine particulière aux spermatozoïdes de la Moule *Mytilus edulis*. Ils ont découvert cette protéine, accidentellement, dans la fraction F₃ extraite selon la méthode 2 de JOHNS (1964). Outre l'histone H3, cette fraction contient un composant de très haute mobilité électrophorétique, ressemblant aux protamines.

Ce composant a été séparé de l'histone H3 sur Biogel P 10, en milieu HCl 0,02N. Il contient 50 p.100 de lysine. Par comparaison, les histones riches en lysine renferment 25 à 30 p.100 de lysine, tandis que les protamines renferment 67 p.100 d'arginine.

Cette composition montre aussi des taux élevés d'alanine, sérine, proline et une analogie évidente avec la composition de la moitié COOH-terminale de l'histone H1, déterminée par BUSTIN et COLE (1970). Le poids moléculaire de cette protéine a été évalué à 5000 daltons environ.

Chez les Céphalopodes, qui constituent un cas particulier, les protéines nucléaires basiques varient considérablement selon les espèces. Chez *Loligo*, il a été établi que dans les spermatozoïdes à maturité, il n'y a pas d'histones. Par contre, il existe une protéine basique qui contient un taux d'arginine considérable: environ 77 p.100. Il apparaît d'ailleurs qu'une augmentation de la basicité et du taux d'arginine des protéines du spermatozoïde va de pair avec une diminution de la quantité d'histones dans le sperme (SUBIRANA et *al.* (1973).

De plus, il est à souligner que chez le Calmar, on trouve un polymorphisme considérable dans ces protéines, tout comme chez les protamines des Salmonidés (DIXON et SMITH, 1968).

Cependant, très peu d'études structurales ont été réalisées à ce jour sur les protéines nucléaires basiques des Mollusques. Seule, la séquence NH₂-terminale (48 résidus) de l'histone H3 a été établie par BRANDT et al. (1974), en comparaison avec la H3 de thymus de Veau et la H3 isolée de différents organismes. Ils n'ont observé que des différences dans les taux de méthylation des résidus de lysine.

Il serait intéressant d'étudier cet embranchement et c'est pourquoi, prochainement, nous entreprendrons l'étude des histones de la Seiche, *Sepia officinalis*, qui fait partie de la classe des Céphalopodes.

Les Céphalopodes comprennent les espèces qui ont évolué dans un environnement le plus compétitif et probablement, les protéines des spermatozoïdes ont dû subir les changements les plus importants pendant l'évolution.

B) LES PROTEINES NUCLEAIRES DES ECHINODERMES

En 1968, SUBIRANA et PALAU ont isolé et caractérisé des protéines "histone-like" du sperme de différents Echinodermes représentant les 4 classes : Echinides, Ophiurides, Astérides et Holothurides. Une étude comparative entre ces différentes classes a permis de retrouver presque toujours 5 fractions analogues à celles du thymus de Veau. Toutefois, la fraction correspondant à l'histone très riche en lysine H1 a une migration variable selon les espèces. De plus, elle semble contenir plus d'arginine que l'histone H1 de thymus de Veau.

1- Mise en évidence d'une nouvelle classe d'histones riches en lysine

Comme SUBIRANA et PALAU, de nombreux auteurs ont mis en évidence une nouvelle classe d'histones riches en lysine et en arginine dans le sperme des Echinodermes.

PALAU et al. (1969), PAOLETTI et HUANG (1969) ont isolé les protéines nucléaires basiques de 2 Oursins, l'un de Méditerranée, *Arbacia lixula*, l'autre de l'Atlantique, *Arbacia punctulata*. Leurs résultats étant très similaires, nous les

avons rassemblés pour comparaison dans le tableau IV. Les fractions $\phi 1$, $\phi 2b$, $\phi 2a1$, $\phi 2a2$ et $\phi 3$ sont décrites par PALAU, les fractions α , β , γ , δ et ϵ étant décrites par PAOLETTI.

On peut noter cependant des différences en ce qui concerne les histones riches en arginine $\phi 2a1$ et $\phi 3$, α et β .

L'histone $\phi 1$ ou γ peut être rapprochée de l'histone H1 de thymus de Veau par son taux élevé de lysine, proline et alanine. Cependant, elle contient beaucoup plus d'arginine et donc est plus basique.

PAOLETTI et HUANG y trouvent aussi de l'histidine, de la cystéine et de la méthionine. Ces 3 acides aminés sont absents de la H1 de Veau.

Une autre différence importante est la grande quantité de $\phi 1$ ou de protéine γ présente dans la chromatine (36 p.100 des protéines basiques totales de la chromatine, selon PAOLETTI et HUANG).

SENSHU (1971) a comparé les histones extraites des érythrocytes de Poulet et du sperme de l'Oursin *Strongylocentrotus purpuratus*. Par fractionnement des histones totales sur CM-Cellulose à l'aide d'un gradient d'éthanol dans l'acide formique, il a démontré l'existence chez cet Oursin d'une protéine très basique S4 qui est éluée plus tard que l'histone H5 de l'érythrocyte de Poulet. Cette protéine possède des analogies avec l'histone spécifique H5 par son taux élevé de lysine, arginine et alanine et son faible taux d'acides aminés dicarboxyliques. La fraction correspondant à l'histone très riche en lysine H1 du thymus de Veau est absente dans le sperme d'Oursin.

SUBIRANA et al. (1970) ont étudié les histones d'embryons d'Oursin *Arbacia lixula* au stade blastula tardif. Ils ont obtenu une protéine très riche en lysine analogue à l'histone H1 qui possède cependant un taux de proline relativement faible, mais non une protéine analogue à $\phi 1$, γ ou S4. Ils suggèrent que les histones de type $\phi 1$ sont caractéristiques du sperme des Oursins.

TABLEAU IV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES HISTONES ISOLEES CHEZ LES OURSINS
 ARBACIA LIXULA (PALAU *et al.*, 1969) ET ARBACIA PUNCTULATA (PAOLETTI *et HUANG*, 1969)
 (Résultats exprimés en moles pour 100 moles d'acides aminés)

Acides aminés	$\phi 1$ (H1)	γ	$\phi 2b$ (H2B)	ϵ	$\phi 2a2$ (H2A)	δ	$\phi 2a1$ (H4)	α	$\phi 3$ (H3)	β
Acide aspartique	2.9	2.8	4.9	5.3	7.1	5.7	6.0	7.6	5.1	4.3
Thréonine	2.9	2.4	5.8	4.2	3.1	4.9	5.7	4.6	5.6	5.8
Sérine	7.4	5.7	10.9	7.4	4.2	6.4	2.8	7.2	4.7	6.7
Acide glutamique	2.6	3.1	6.3	6.4	8.5	8.4	7.7	11.8	11.8	11.1
Proline	8.0	8.4	6.0	4.0	3.9	4.1	1.6	Tr	4.6	2.0
Glycine	4.9	7.1	7.2	11.8	11.4	10.1	14.9	8.9	7.9	12.3
Alanine	23.3	19.3	13.1	13.6	14.1	11.8	8.2	13.1	13.7	12.4
1/2 Cystine		Tr		<u>1.0</u>		<u>2.0</u>		Tr		<u>1.5</u>
Valine	3.3	3.3	5.7	5.5	5.6	6.3	7.3	5.9	5.4	4.0
Méthionine		<u>1.5</u>		4.1		<u>1.3</u>		5.1		6.0
Isoleucine	3.4	3.0	3.3	3.0	3.9	3.6	5.4	3.4	4.4	3.8
Leucine	1.9	1.9	4.6	4.7	11.2	7.5	8.8	7.2	10.0	8.4
Tyrosine	1.1	0.7	2.6	0.9	2.5	1.4	3.4	Tr	2.1	0.7
Phénylalanine	0.6	0.6	1.4	0.9	1.9	1.9	2.3	Tr	2.5	0.7
Histidine	<u>1.2</u>	<u>0.3</u>	1.8	1.7	1.9	1.2	2.4	Tr	1.4	Tr
Lysine	24.6	27.5	15.5	14.3	11.3	11.9	10.3	10.6	9.3	6.7
Arginine	<u>11.7</u>	<u>10.3</u>	<u>10.4</u>	<u>10.7</u>	9.3	11.6	13.0	14.4	11.5	15.3
Lys / Arg	2.10	2.67	1.49	1.34	1.21	1.02	0.79	0.74	0.81	0.44



PAOLETTI et HUANG (1969) avaient constaté que les cellules du sperme d'Oursin, comme les érythrocytes du Poulet, sont des cellules hautement différenciées. Elles ont, par contre, une activité mitotique nulle, une activité génétique réduite, une chromatine fortement condensée. Et ces 2 types de cellules contiennent une nouvelle classe de protéines basiques: la protéine γ dans le sperme d'Oursin, l'histone H5 dans l'érythrocyte de Poulet.

Il serait intéressant de savoir si les histones de type H2B du sperme de différents Oursins sont aussi différentes dans leur composition en acides aminés.

STRICKLAND et *al.* (1974b) ont récemment isolé 2 types d'histone H2B chez l'Oursin *Parechinus angulosus*. Ces 2 types montrent une richesse en arginine surprenante et de remarquables différences avec l'histone H2B du thymus de Veau (voir page 39).

Une autre étude qui nous paraît intéressante, mais qui ne concerne toutefois pas les Echinodermes, a été réalisée par SHAW et SEAMONDS (1972) sur une espèce de Ver marin à érythrocytes nucléés: *Glycera dibranchiata*.

L'électrophorèse analytique des protéines chromosomales totales révèle une très faible quantité de protéines non histones (11 p.100 de la fraction totale) et surtout l'absence apparente d'une histone riche en lysine de type H1. Par contre, ils ont mis en évidence une protéine H-1 qui possède un taux élevé de sérine et un rapport lysine/arginine semblable à celui de l'histone H2B.

L'histone H5, riche en lysine, alanine, sérine et arginine n'a pas pu être isolée des érythrocytes nucléés de *Glycera dibranchiata*. A l'inverse de ce qui se produit dans les érythrocytes de Poulet, la perte de l'histone H1 pendant la maturation des érythrocytes n'est pas compensée par l'apparition de l'histone H5.

SUBIRANA (1970) a établi, d'après la comparaison des protéines nucléaires d'un tissu somatique (le système hémal) et d'un tissu germinale (gonades mâles) d'une même espèce

ce *Holothuria tubulosa*, que les histones somatiques sont toutes conservées dans le sperme, la seule différence résidant dans le faible taux de proline de l'histone H1 qui est cependant typique. En même temps, il apparaît un nouveau composant de migration plus rapide. Il est intéressant de noter que dans cet Echinoderme, les transformations qui interviennent durant la spermiogénèse sont relativement peu importantes par comparaison avec la maturation du sperme des poissons, par exemple, qui s'accompagne d'un remaniement complet des protéines nucléaires basiques.

PHELAN et al. (1972) ont étudié ce groupe d'histones riches en lysine des gonades de l'Holothurie; ils ont pu, par chromatographie d'échanges d'ions sur Amberlite IRC-50, séparer 2 familles d'histones H1, dont une semble spécifique à cet Echinoderme, et est éluée entre les histones de type H2B et les histones riches en arginine.

La même expérience, réalisée sur un tissu somatique de la même espèce d'Echinoderme (intestins), n'a montré qu'une seule famille de H1, typique, analogue à la H1 de thymus de Veau.

L'histone H1 spécifique des gonades de l'Holothurie est plus riche en arginine que l'histone H1 non spécifique: 35 p.100 des peptides tryptiques diffèrent entre les 2 familles. Il se pourrait, cependant, qu'une partie de la molécule soit analogue entre ces 2 protéines, les différences étant localisées dans une autre région, plus variable, de la molécule.

SUBIRANA et UNZETA (1972) ont pensé que la différence de mobilité électrophorétique observée pour l'histone très riche en lysine $\phi 1$, lorsqu'elle est isolée de gamètes à maturité ou en cours de maturation, pouvait être due à une modification de cette molécule pendant la gamétogénèse. Ils ont démontré, par action de la phosphatase alcaline de *Escherichia coli* sur les protéines $\phi 1$ et $\phi 2b$ que ces histones sont phosphorylées dans les gamètes en cours de maturation, l'histone $\phi 1$ dans une plus grande proportion que l'histone $\phi 2b$.

D'ailleurs, INGLES et DIXON (1972) ont déjà signalé le fait lors de la gamétogénèse chez la Truite. Cela peut suggérer que dans d'autres espèces, ce mécanisme pourrait aussi intervenir afin de prévenir l'interférence des protéines basiques nouvellement synthétisées avec les protéines cellulaires.

2- Etudes structurales des histones d'Echinodermes

Les études structurales réalisées à ce jour sur les histones d'Echinodermes sont le fait de 2 équipes de chercheurs: celle de CAPETOWN (STRICKLAND, BRANDT et VON HOLT) et notre équipe de LILLE (SAUTIERE et collaborateurs).

a- Résultats acquis par VON HOLT et ses collaborateurs sur les histones du sperme d'Oursin PARECHINUS ANGULOSUS

a) Histone H3

La séquence NH₂-terminale (48 résidus) de l'histone H3 a été déterminée en comparaison avec celle du Veau, établie par DELANGE et *al.* (1973), celle du Poulet, établie par BRANDT (1972), celle d'un Requin, d'un Mollusque et d'une plante (BRANDT et *al.*, 1974).

La composition en acides aminés de l'histone H3 de l'Oursin paraît identique à celle de l'histone H3 de thymus de Veau. Elle ne contient toutefois qu'une seule cystéine. La séquence des 48 premiers résidus est absolument identique à celle de l'histone H3 de thymus de Veau. Le résidu de lysine en position 9 est méthylé à 20 p.100; le résidu de lysine en position 27 est méthylé à 40 p.100, au lieu de 70 p.100 chez le Veau; et enfin, le résidu de lysine en position 36 est méthylé à 20 p.100. Il ne l'est pas chez le Veau.

b) Histone H4

STRICKLAND et *al.* (1974a) ont déterminé la séquence COOH-terminale (51 résidus) de l'histone H4. La compo-

sition en acides aminés de cette histone est semblable à celle de l'histone H4 de Veau. Toutefois, une thréonine disparaît et une cystéine apparaît. Ils en ont déduit que l'une remplace l'autre.

Par coupure au bromure de cyanogène de la protéine au niveau de l'unique résidu de méthionine, ils ont obtenu 2 peptides. Le peptide COOH-terminal de 18 résidus ne contenait pas de cystéine. Le peptide NH₂-terminal qui contenait la cystéine a été hydrolysé au niveau des liaisons aspartyles par l'HCl 0,03N pendant 12 heures. Ils ont ainsi isolé un peptide correspondant au peptide 68-84 de l'histone H4 de thymus de Veau, contenant la cystéine.

Par dégradation automatique de EDMAN, ils ont identifié cette cystéine en position 73.

γ) Histone H2B

Les mêmes auteurs ont déterminé la séquence amino-terminale de 2 histones H2B qu'ils ont identifiées chez l'Oursin (STRICKLAND et *al.*, 1974b). Ils connaissent actuellement les 37 résidus NH₂-terminaux de l'histone H2B1 et les 41 résidus NH₂-terminaux de l'histone H2B2.

Ces séquences NH₂-terminales sont présentées dans le tableau V. Elles montrent de nombreuses séquences répétitives. On voit, par exemple, 3 fois la séquence Ser-Pro-Thr-Lys-Arg entre les résidus 5 et 19 de l'histone H2B1. Dans la partie NH₂-terminale de l'histone H2B2, on retrouve 2 fois la séquence Ser-Pro-Arg-Lys-Gly et 3 fois la séquence Gly-Lys-Gly (tableau V).

Les histones H2B1 et H2B2 présentent certaines analogies l'une avec l'autre, particulièrement entre les résidus 23 à 37 de l'histone H2B1 et 27 à 41 de l'histone H2B2.

En outre, la séquence NH₂-terminale de l'histone H2B2 présente une certaine analogie avec la séquence NH₂-terminale de l'histone H2B de thymus de Veau. Par contre, la séquence comprise entre les résidus 27 à 41 de l'histone H2B2 présente une étroite analogie avec la séquence NH₂-terminale (résidus 1 à 9) de l'histone H4 de thymus de Veau (tableau VI).

TABLEAU V

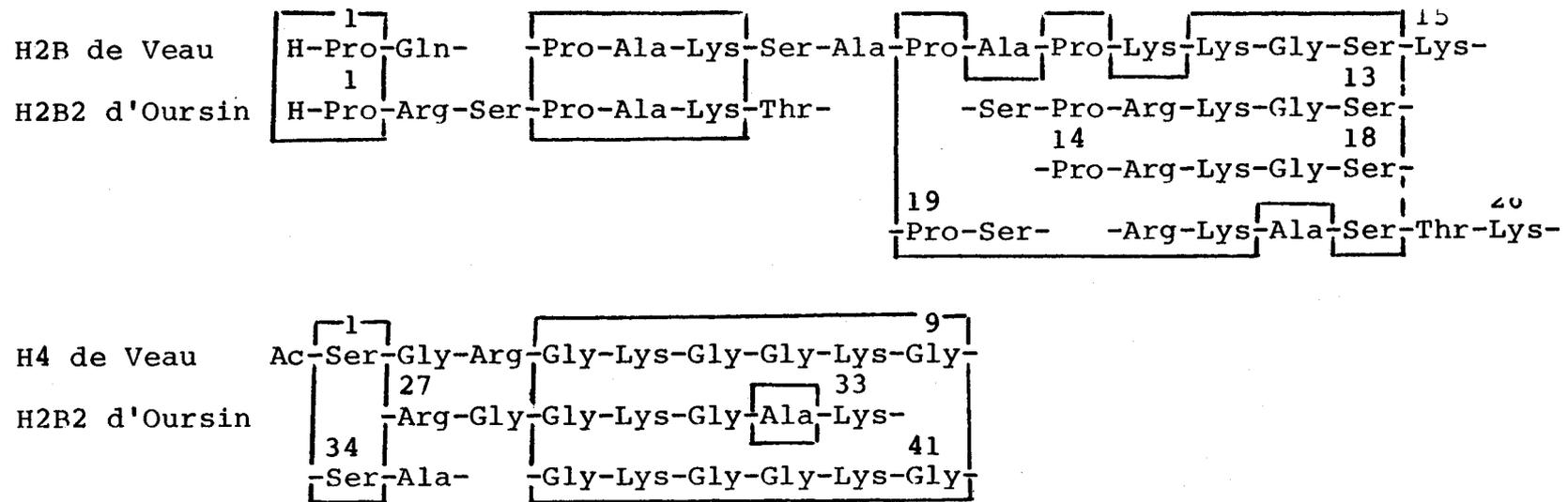
SEQUENCES PARTIELLES EN ACIDES AMINES DES DEUX SOUS-FRACTIONS
H2B1 ET H2B2 ISOLEES CHEZ L'OURSIN *PARECHINUS ANGULOSUS*.
(Strickland *et al.*, 1974b)

H2B1	1		9
	H-Pro-Ser-Gln-Lys-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-		
	10		14
	-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-		
	15		19
	-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-		
	20		27
	-Ser-Pro-Gln-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-		
		28	31
		-Gly-Lys-Ser-Ala-	
		32	34
		-Lys-Arg-Gly-	
		35	37
		-Gly-Lys-Ala-	
H2B2	1		7
	H-Pro-Arg-Ser-Pro-	-Ala-Lys-Thr-	
	8		12
	-Ser-Pro-	-Arg-Lys-Gly-	
	13		17
	-Ser-Pro-	-Arg-Lys-Gly-	
	18		23
	-Ser-Pro-Ser-Arg-Lys-Ala-		
	24		31
	-Ser-Thr-	-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys-Gly-	
		32	35
		-Ala-Lys-Ser-Ala-	
		36	38
		-Gly-Lys-Gly-	
		39	41
		-Gly-Lys-Gly-	



TABLEAU VI

ANALOGIES DE SEQUENCE ENTRE L'HISTONE H2B2
D'OURSIN ET LES HISTONES DE THYMUS DE VEAU
(STRICKLAND *et al.*, 1974b)



δ) Histone H1

STRICKLAND et *al.* (1976) ont déterminé la séquence médiane (59 résidus) de l'histone H1 d'Oursin, qu'ils ont comparée à la séquence connue de l'histone H1 de Lapin (RALL et COLE, 1971; JONES et *al.*, 1974), à celle de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet (SAUTIERE et *al.*, 1975). Ils en concluent que la répartition des différents types d'acides aminés sont similaires dans les 4 protéines: les groupes NH₂-terminaux sont bloqués, les régions NH₂-terminales sont riches en proline et légèrement basiques, les régions médianes sont hydrophobes et les régions COOH-terminales très basiques, spécialement la H1 d'Oursin.

Cependant, certaines différences sont à noter: l'histone H1 d'Oursin, comme la H5, est riche en arginine. Contrairement aux autres H1 et à la H5, elle contient 4 résidus de méthionine.

Les auteurs pensent que l'histone H1 d'Oursin jouerait un rôle identique à celui de l'histone H5 de Poulet dans la répression de la transcription dans les spermatozoïdes.

b- Résultats personnels- Raisons du choix du sujet

Les travaux de DELANGE (1969a, 1969b) ont démontré que l'histone H4 avait peu varié pendant l'évolution des espèces. D'autre part, l'étude électrophorétique comparative des histones réalisée chez un grand nombre de Vertébrés (PANYIM et *al.*, 1971) a montré que les histones H3 et H4 avaient une mobilité électrophorétique constante, quelle que soit leur origine, tandis que les histones H2A, H2B et surtout H1 présentaient des variations de mobilité.

Ces résultats confirment ce que les études structurales avaient montré à propos de l'histone H4, et traduisent une variabilité de la structure primaire des histones H1, H2A et H2B durant l'évolution. L'histone H3, comme l'histone H4, apparaît stable.

Nous avons donc pensé qu'il était indispensable de "descendre" assez bas dans l'échelle de l'évolution et d'étudier des espèces très primitives afin de mieux saisir les mutations.

En fait, dès 1971, nous avons fixé notre choix sur les Echinodermes et les Céphalopodes.

- Les Echinodermes sont des organismes très primitifs et se placent sur l'échelle de l'évolution dans une position particulièrement intéressante sur la branche gauche qui donne naissance au groupe des Vertébrés (voir figure 6).

- Quant aux Céphalopodes, ils sont placés sur la branche droite de l'arbre phylogénétique, qui donne naissance au groupe des Arthropodes. En dépit de cette position, ils sont assez proches des Vertébrés en ce qui concerne, par exemple, l'organisation de leur système nerveux.

D'autre part, des études structurales nécessitent une certaine quantité de matériel et il nous fallait choisir des espèces que nous pouvions trouver en abondance dans notre région. La proximité du Laboratoire de Biologie Maritime de WIMEREUX nous a été précieuse, car nous avons pu obtenir en quantité suffisante des Echinodermes : *Psammechinus miliaris* et *Asterias rubens* et un Céphalopode : *Sepia officinalis*.

Nous nous sommes d'abord attachée à l'isolement et à la caractérisation des histones de gonade d'Oursin et nous avons déterminé la séquence complète en acides aminés des histones H4 et H2A. Ce travail est présenté dans la seconde partie de ce mémoire.

Tous les travaux réalisés sur les histones d'Invertébrés marins montrent la présence de protéines spécifiques à la fois chez les Mollusques (protéines basiques intermédiaires entre les histones et les protamines) et chez les Echinodermes (famille d'histones H1 spécifiques, riches à la fois en lysine et en arginine qui pourraient former avec l'histone H5 spécifique de l'érythrocyte de Poulet une nouvelle classe d'histones).

En ce qui concerne les autres histones, elles sont retrouvées chez les Invertébrés marins, mais plus ou moins modifiées. Ce point sera discuté plus loin, au sujet des histones H2A et H2B.

CHAPITRE II

ISOLEMENT ET CARACTERISATION

DES HISTONES DE GONADE D'OURSIN

I- ISOLEMENT DES HISTONES

Les gonades sont prélevées sur l'animal vivant et congelées immédiatement sur la neige carbonique. Elles sont conservées à -20° C jusqu'au moment de leur utilisation.

Dans la plupart des cas, l'extraction de la chromatine est précédée de l'isolement des noyaux, afin d'éviter la contamination éventuelle par les protéines cytoplasmiques.

Les gonades sont des organes où les mitoses sont très actives et donc où les noyaux sont très nombreux. Certains auteurs dont STRICKLAND et *al.* (1974a) ont isolé les histones directement à partir du tissu génital, comme il est généralement fait pour le thymus de Veau.

Nous avons utilisé les 2 méthodes pour la préparation de nos histones.

A) Isolement des noyaux

Les noyaux sont isolés selon un protocole dérivé de la méthode de MURAMATSU (1963) et purifiés selon la technique de CHAUVEAU (1956).

Au cours des préparations, quelques modifications se sont introduites dans la technique utilisée au laboratoire et décrite par SAUTIERE et *al.* (1971b).

Toutes les manipulations sont effectuées à $+4^{\circ}$ C et toutes les solutions utilisées contiennent du DFP (diisopropylfluorophosphate), inhibiteur des protéases, à la concentration 0,1 mM.

Les gonades (par lot de 200 à 250 g) sont émincées et homogénéisées dans 2l d'une solution de saccharose 0,33M, CaCl_2 0,003M, à l'aide d'un homogénéiseur Waring Blen-

dor (basse vitesse, 1 minute). L'homogénat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze hydrophile et centrifugé à 1100g pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires (Centrifugeuse Internationale, type PR2). Les noyaux sont lavés 1 fois avec 1l de la même solution.

Ils sont ensuite purifiés par homogénéisation dans 250 ml d'une solution de saccharose 2,2M contenant 0,5 p.100 de Triton X-100 et centrifugation à 36000g pendant 90 minutes.

A cette concentration, le Triton X-100 qui est un détergent non ionique permet d'enlever la membrane nucléaire externe sans dommage pour le noyau et d'obtenir ainsi des préparations de noyaux très propres, non contaminées par du matériel cytoplasmique.

B) Isolement de la désoxyribonucléoprotéine (DNP)

Cet isolement est fondé sur l'insolubilité de la DNP en milieu isotonique NaCl 0,14M, citrate de Na 0,01M de pH 7,1.

1- A partir des noyaux purifiés

Les noyaux purifiés sont homogénéisés dans 500 ml de NaCl 0,14M, citrate trisodique 0,01M de pH 7,1, à l'aide d'un homogénéiseur Waring Blendor (grande vitesse, 1 minute). La DNP, insoluble dans ce milieu isotonique, est récupérée par centrifugation à 1100g pendant 15 minutes.

La DNP est lavée 2 fois avec 500 ml de la même solution et 1 fois avec 500 ml de tampon TRIS 0,1M de pH 7,6 (STEELE et al., 1963). Elle est ensuite lavée 3 fois avec 500 ml de NaCl 0,35M pour éliminer toutes les protéines non histones qui pourraient subsister et enfin 2 fois avec 500 ml d'éthanol à 80 p.100.

La DNP ainsi purifiée est soumise ensuite à l'extraction des histones.

2- A partir du tissu total (STRICKLAND et al., 1974a)

Les gonades (par lot de 250 g) sont émincées et homogénéisées dans 1l de NaCl 0,14M, citrate de Na 0,01M de pH 7,1, à l'aide d'un homogénéiseur Waring Blendor (grande vitesse, 1 minute). L'homogénat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze hydrophile et centrifugé à 4000g pendant 10 minutes, à 0° C (Centrifugeuse Martin Christ, type Universal Junior II KS). Le sédiment obtenu constitué par la DNP est lavé 2 fois avec 1l de la même solution, 1 fois avec 1l de la même solution contenant 0,2 p.100 de Triton X-100, 1 fois encore avec 1l de solution saline sans Triton et 2 fois avec 1l d'éthanol à 90 p.100 très froid (-20° C).

Le sédiment obtenu est soumis à l'extraction des histones.

C) Extraction des histones

Pour obtenir les différentes fractions d'histones, il est nécessaire soit de fractionner les histones totales par des méthodes chromatographiques ou chimiques, soit d'utiliser des méthodes d'extraction sélective.

1- Extraction des histones totales

Les histones, protéines basiques, sont solubles dans les acides forts dilués. Il est préférable, pour obtenir les histones totales avec un bon rendement, d'utiliser l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique car des acides plus faibles tels que les acides phosphorique, formique, acétique ou perchlorique ne réalisent qu'une extraction partielle des histones.

Nous avons utilisé 1'HCl 0,25N pour extraire les histones totales de gonade d'Oursin.

a- Méthode d'extraction

Le sédiment constitué par la DNP est homogénéisé dans 300 ml d'HCl 0,25N (Waring Blendor, grande vitesse, 1 minute) et l'extraction est poursuivie sous agitation à +4° C pendant 18 heures (agitateur-secoueur Prolabo). La suspension est alors centrifugée à 1100g pendant 30 minutes et le sédiment obtenu est encore extrait 2 fois avec 150 ml d'HCl 0,25N, pendant 2 heures.

Les 3 surnageants rassemblés sont filtrés sur verre fritté n° 4, dialysés contre de l'eau désionisée et lyophilisés.

b- Fractionnement des histones totales

Pour obtenir les différentes fractions d'histones à partir des histones totales, plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- méthodes chromatographiques

Amberlite IRC 50 (LUCK et *al.*, 1958; RASMUSSEN et *al.*, 1962)

Carboxyméthylcellulose (SAUTIERE, 1959; PHILLIPS et *al.*, 1959; JOHNS et *al.*, 1960)

Biogel P 60 (BÖHM et *al.*, 1973)

- méthodes chimiques (OLIVER et *al.*, 1972)

Pour notre part, nous avons préféré obtenir les différentes fractions d'histones par extraction sélective à partir de la DNP.

2- Extraction sélective des histones

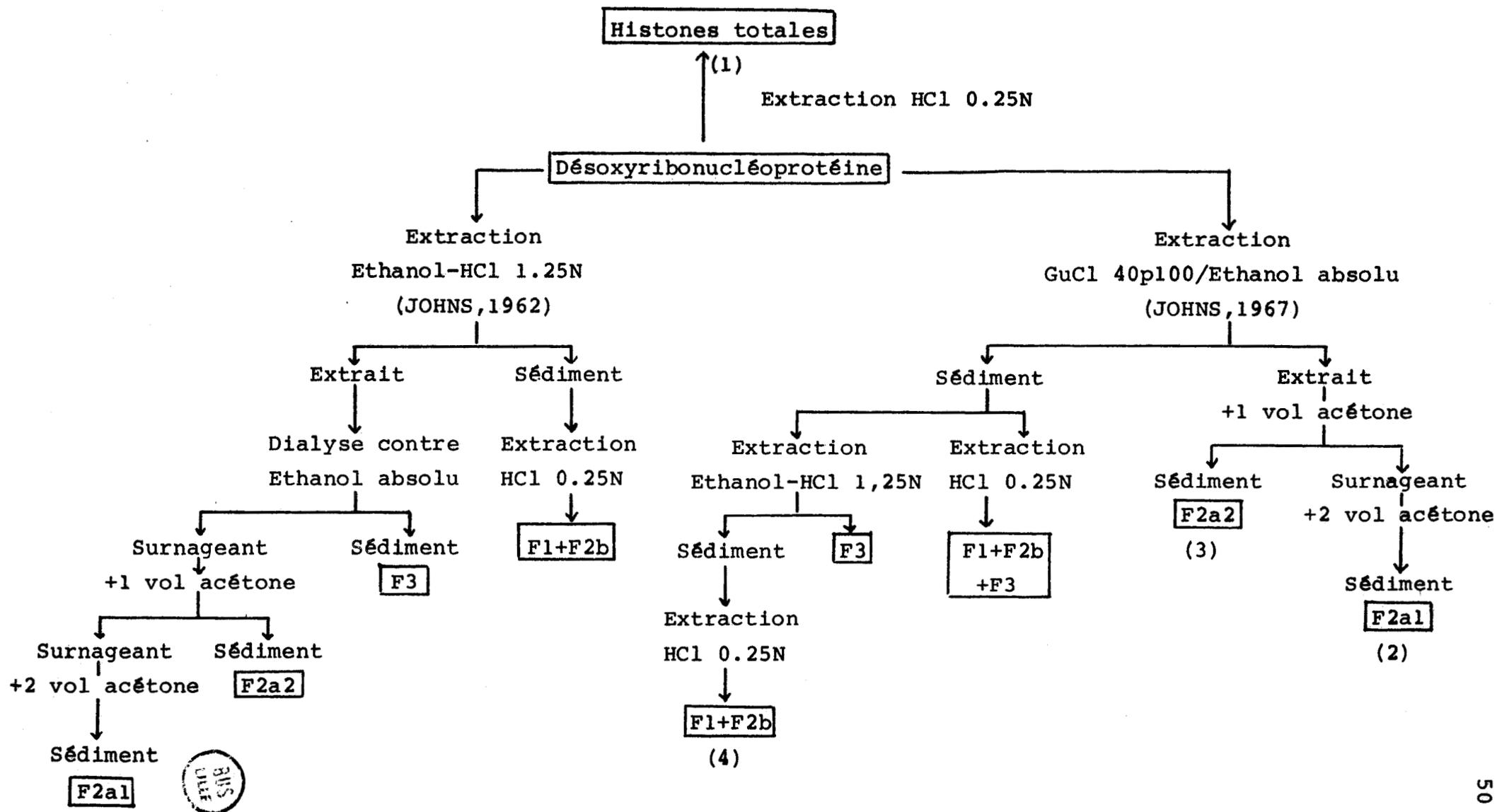
Les méthodes que nous avons utilisées pour la préparation de nos histones sont rassemblées dans le tableau VII.

Lors des premières préparations, nous avons utilisé la technique décrite par JOHNS (1967) qui permet d'extraire sélectivement les fractions F_{2a1} et F_{2a2} par le mélange éthanol-chlorhydrate de guanidine à pH 7,0.

TABLEAU VII

METHODES DE PREPARATION DES HISTONES DE GONADE D'OURSIN.

(Les chiffres entre parenthèses indiquent le numéro du gel correspondant à la fraction dans la figure ?).



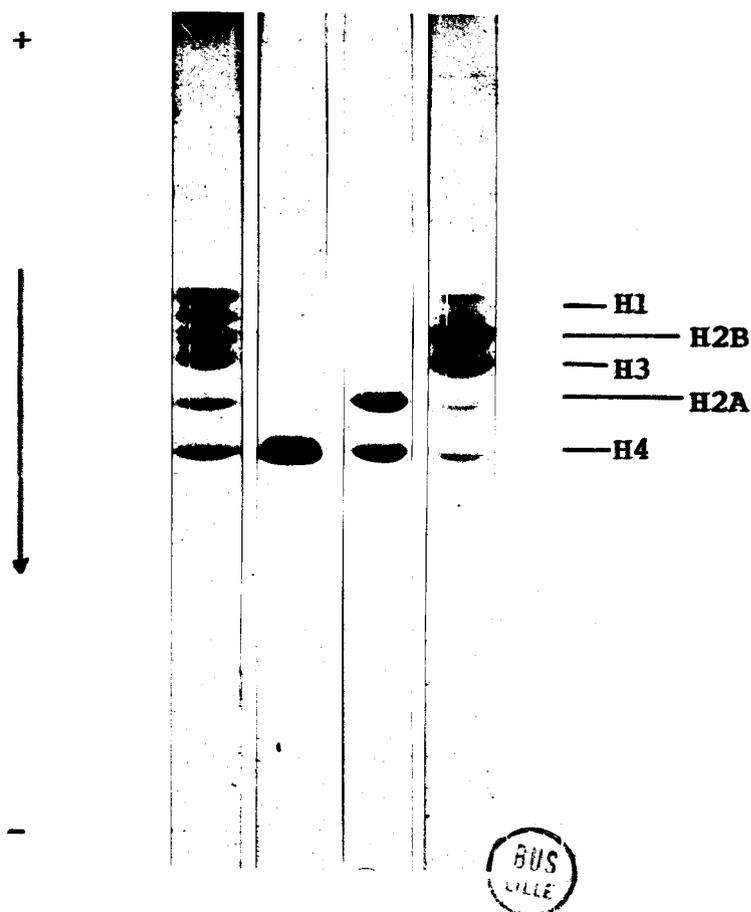


FIGURE 7

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE, A pH 2,7, DES FRACTIONS D'HISTONES OBTENUES LORS DES PREPARATIONS

Les numéros inscrits sur les gels correspondent aux numéros inscrits sur le tableau VII.

Gel n° 1 : Histones totales de gonade d'Oursin, extraites par l'HCl 0,25N.

Gel n° 2 : Fraction F_{2a1} extraites par le mélange Ethanol/GuCl

Gel n° 3 : Fraction F_{2a2} 3 1

Gel n° 4 : Fraction F₁ + F_{2b} extraite par l'HCl 0,25N.

En dépit d'une extraction préalable de la chromatine par le mélange Ethanol/HCl, cette fraction est fortement contaminée par l'histone H3.

Les autres fractions F_1 , F_{2b} et F_3 sont ensuite extraites simultanément de la DNP par l'HCl 0,25N.

Par la suite, nous avons extrait l'ensemble des histones riches en arginine par l'éthanol-HCl (JOHNS, 1964). Cependant, lors de la dialyse contre l'éthanol absolu, nous n'avons jamais pu obtenir de précipitation de la fraction F_3 .

Finalement, nous avons adopté la technique suivante:

- extraction de la fraction F_{2a} par le mélange éthanol-chlorhydrate de guanidine
- extraction de la fraction F_3 par l'éthanol-HCl
- extraction du mélange $F_1 + F_{2b}$ par l'HCl 0,25N

L'intérêt du traitement de la chromatine par le mélange éthanol-HCl, après extraction de la fraction F_{2a} ne réside pas dans l'extraction de la fraction F_3 qui est obtenue avec un rendement très médiocre mais dans l'extraction presque complète des histones riches en arginine avant l'extraction des histones riches en lysine par l'HCl 0,25N.

Les rendements que nous avons obtenus lors des différentes méthodes de préparation sont toujours faibles, environ 14 fois plus faibles que ceux obtenus lors de la préparation des histones de thymus de Veau.

D) Purification des différentes histones

1- Isolement de l'histone H4 à partir de la fraction F_{2a1}

La fraction F_{2a1} renferme deux composants: l'un majeur- 70 à 80 p.100 de la fraction - est l'histone H4; le second, mineur, est l'histone H2A (figure 7, gel n° 2).

a- *Chromatographie sur Sephadex G-100*

L'isolement et la caractérisation de l'histone H4 de gonade d'Oursin a fait l'objet d'une publication dans B. B. A. (1974). Nous nous permettons d'inclure ici la reproduction de cette publication.

Reprinted from

Biochimica et Biophysica Acta, 342 (1974) 360-366

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Printed in The Netherlands

BBA 36688

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GLYCINE, ARGININE, LYSINE-RICH AND ALANINE, LEUCINE, GLYCINE-RICH HISTONES FROM SEA URCHIN GONAD

DANIÈLE WOUTERS-TYROU, PIERRE SAUTIÈRE and GÉRARD BISERTE

Institut de Recherches sur le Cancer, et U124 INSERM, B.P. 3567-59020 Lille Cedex (France)

(Received October 22nd, 1973)

SUMMARY

Glycine, arginine, lysine-rich histone and alanine, leucine, glycine-rich histone were isolated from the gonads of sea urchin *Psammechinus miliaris* and characterized by the amino acid composition and disc electrophoresis.

Comparative studies with homologous calf thymus histones were performed.

Sea urchin glycine, arginine, lysine-rich histone is shown to contain cysteine. Alanine, leucine, glycine-rich histone, although similar in many aspects to calf alanine leucine, lysine-rich histone, differs markedly in the threonine, serine, phenylalanine and histidine content.

INTRODUCTION

Comparative studies performed on glycine, arginine, lysine-rich histone (GRK-histone) isolated from different animal and plant species [1-5] have shown a remarkable conservation of the amino acid sequence of this protein through evolution. This implies for GRK-histone a very particular function of vital importance.

For the other four types of histone, very few comparative studies on primary structure have been performed [6-9]. The electrophoretic analysis of whole histone of numerous species [10] indicates for these types a more or less high mutation rate. To look for mutations, histones of Echinoderms, which are rather primitive organisms, appear to be a good material.

Abbreviations: the three-letter code used for the designation of histones emphasizes the three most abundant amino acids present in their molecule. GRK-histone: glycine, arginine, lysine-rich histone. ALK-histone: alanine, leucine, lysine-rich histone. ARE-histone: alanine, arginine, glutamic acid-rich histone. This nomenclature has been proposed by the Gordon research conference on chromosomal proteins held in July 1972 at Beaver Dam, Wisconsin to the National Academy of Sciences, National Research Council, Commission on Nomenclature, Dr Waldo Cohn, Chairman, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee. ALG-histone: alanine, leucine, glycine-rich histone. ALG-histone was not discussed at the Gordon conference but is proposed by the authors in agreement with the nomenclature adopted at that conference.

MATERIALS AND METHODS

Gonads of the sea urchin *Psammechinus miliaris* were frozen in solid CO₂ after excision and kept at -20 °C until use.

Preparation of chromatin. Chromatin was obtained from purified nuclei as described previously [4].

Preparation of histones. Selective extraction of arginine-rich histones was performed according to Method 2 of Johns [11] with ethanol-1.25 M HCl (4:1, v/v).

In several instances, the F_{2a} histone fraction was extracted by ethanol-40% guanidinium chloride (purissimum grade purchased from Fluka), pH 7.0, (3:1, v/v) and subsequently fractionated in F_{2a1} and F_{2a2} histone fractions by differential acetone precipitation as described by Johns [12].

GRK-histone was isolated from the F_{2a1} fraction by gel filtration chromatography on a Sephadex G-100 column (200 cm × 2.5 cm) using 0.01 M HCl as eluent.

Alanine, leucine, glycine-rich histone (ALG-histone) was isolated from the F_{2a2} fraction by ion-exchange chromatography on Biorex 70 (200-400 mesh) according to a procedure adapted from Luck et al. [13]. The column (60 cm × 2.5 cm) was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8 containing 8% guanidinium-chloride and eluted with a linear gradient of guanidinium chloride from 8 to 15% in the same buffer [14]. Further purification of ALG-histone was achieved by gel filtration chromatography on Sephadex G-100 with 0.01 M HCl as eluent.

Analytical procedures. Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out at pH 4.5 according to Reisfeld et al. [15] using a 17% acrylamide concentration or at pH 2.7 according to Panyim and Chalkley [16].

Amino acid analyses were performed with a Technicon amino acid analyzer on histone samples hydrolyzed under vacuum with 5.7 M HCl (1 ml per mg of protein)* at 110 °C for 24 and 72 h.

RESULTS

The chromatographic pattern of the F_{2a1} histone fraction from sea urchin gonad is shown in Fig. 1A, comparatively with that of the F_{2a1} histone fraction from calf thymus (Fig. 1B).

The two patterns show three and two fractions, respectively, and are different with respect to Fraction U₁ which is not present in the F_{2a1} histone fraction from calf thymus. This Fraction U₁ disappears after treatment of the F_{2a1} histone fraction by 0.5 M 2-mercaptoethanol at 25 °C for 24 h (Fig. 1C).

Fractions U₂ and U₃ correspond to Fractions C₂ and C₃ with respect to the elution volume.

In polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 2), only Fraction U₃ appears to be homogeneous. Fraction U₁ shows three bands: the fast-moving band which appears also in Fractions U₂ and U₃ and corresponds to GRK-histone, the two slow-moving bands disappear after treatment of Fraction U₁ by 0.5 M 2-mercaptoethanol in 0.01 M HCl-8 M urea at room temperature for 18 h.

The amino acid analysis of the U₁ and U₃ fractions is given in Table I. Both

* One drop of 1% phenol was added to prevent the destruction of tyrosine.

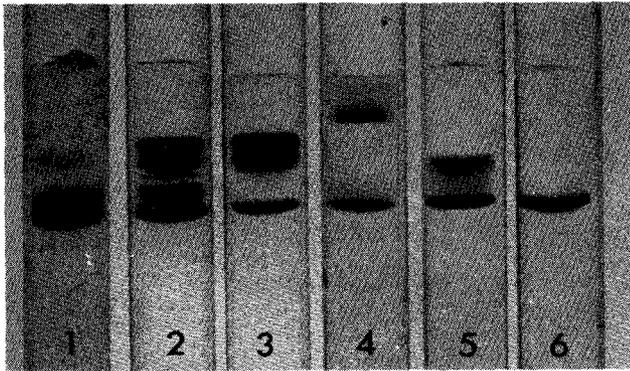


Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of the F_{2a1} histone fraction. Gel 1 represents the F_{2a1} fraction from calf thymus. Gel 2 is the homologous fraction from *P. miliaris* gonads. Gel 3 is Fraction U_1 obtained as indicated in Fig. 1. Gel 4 is the same fraction treated with 2-mercaptoethanol. Gel 5 is Fraction U_2 of Fig. 1. Gel 6 represents Fraction U_3 of Fig. 1 which is the GRK-histone from *P. miliaris* gonads. The gels are arranged to align the appropriate fractions. Electrophoresis was carried out at 6 mA per tube for 90 min at pH 4.5 [15]. Gels were stained for 30 min with 1% Amido black 10B in the mixture acetic acid-ethanol-water (1:2:7, by vol.) and destained for 48 h.

TABLE I

AMINO ACID COMPOSITION OF SUB-FRACTIONS U_1 AND U_3 OBTAINED BY GEL FILTRATION CHROMATOGRAPHY OF THE F_{2a1} HISTONE FRACTION FROM SEA URCHIN *PSAMMECHINUS MILIARIS* GONADS

All values are expressed as percent moles of amino acids recovered. tr, trace. Amino acid compositions of the F_{2a1} histone fraction from sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* sperm and from calf thymus GRK-histone are given for comparison.

Amino acids	U_1	U_3	F_{2a1} <i>S. purpuratus</i> (Johnson et al. [18])	Calf thymus GRK [1]
Aspartic acid	4.4	4.9	3.9	5.2
Threonine	5.8	5.2	5.3	6.7
Serine	1.8	2.2	5.0	2.6
Glutamic acid	6.2	6.6	6.8	6.7
Proline	1.1	1.4	3.1	1.2
Glycine	17.1	16.7	18.0	16.8
Alanine	7.6	7.2	7.4	7.1
Half-cystine	0.8	0.5	tr	0
Valine	8.0	8.9	7.7	8.3
Methionine	1.0	0.9	1.0	0.8
Isoleucine	5.5	5.6	4.5	5.4
Leucine	8.4	8.0	7.7	7.8
Tyrosine	3.7	3.8	3.0	3.8
Phenylalanine	2.0	2.0	2.1	1.9
Lysine	10.2	10.0	9.4	9.7
Histidine	2.0	1.9	1.9	1.8
Arginine	13.6	13.4	12.9	13.2
<i>ε</i> -Methyllysine	0.7	0.7		1.0
Total residues	99.9	99.9	99.7	99.9
Lysine/arginine	0.80	0.80	0.73	0.81
Basic/acidic	2.50	2.26	2.26	2.16

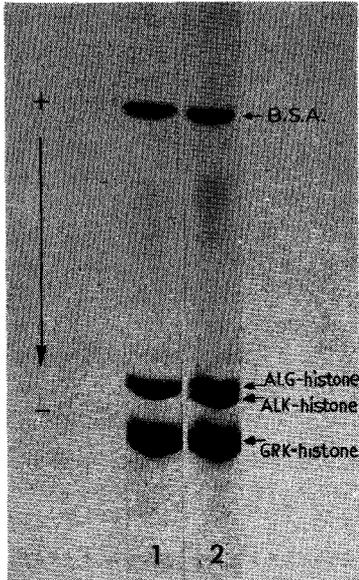


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of GRK- and ALG-histones from sea urchin gonads and of GRK- and ALK-histones from calf thymus. Gel 1: ALG- and GRK-histones (20 μ g) from *P. miliaris*. Gel 2: ALG (20 μ g) from *P. miliaris* ALK- and GRK-histones (20 μ g) from calf thymus. Bovine serum albumine (BSA) (10 μ g) was used as a marker. Electrophoresis, staining and destaining of the gels were performed as described by Panyim and Chalkley [16].

Slightly less basic than calf alanine, leucine, lysine-rich histone (ALK-histone), ALG-histone has a slower electrophoretic mobility as shown in Fig. 4.

DISCUSSION

GRK-histone obtained from sea urchin *P. miliaris* was shown to contain cysteine. This only noticeable difference with the calf GRK-histone appears to be a common feature for this protein in Echinoderms [18–20].

The presence of cysteine in this histone has to be related to the occurrence of polymers as shown in the chromatographic and electrophoretic patterns (Figs 1 and 2) of the F_{2a1} histone fraction. Similar electrophoretic patterns have been obtained by Subirana [21] with the F_{2a1} histone fraction from sea urchin *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus* and from sea cucumber *Holothuria tubulosa*.

Sea urchin ALG-histone and calf ALK-histone are closely related to each other as indicated by the general features of their amino acid composition. However, important differences appear for threonine, serine, phenylalanine and histidine values.

Two residues of phenylalanine and two residues of histidine are found in ALG-histone, whereas in ALK-histone, the number of residues for these two amino acids is 1 and 4, respectively. A similar deletion in histidine was found by Bailey and Dixon [9] in the homologous histone from Rainbow Trout.

Thus, the primary structure of the ALK-type histone appears to be less conservative from species to species than that of GRK-histone.

b- Chromatographie sur Biogel P 60

Cependant, actuellement au laboratoire, l'histone H4 est obtenue par chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 60, comme il a été décrit par BÖHM et *al.* (1973).

30 à 35 mg de protéine sont dissous dans 1,5 ml d'HCl 0,01N, urée 8M, 2-mercaptoéthanol 1 p.100 et laissés à + 4° C pendant 48 heures. Après dilution au demi avec 1,5 ml de tampon HCl 0,01N, NaCl 0,05M, azide de Na 0,02 p.100, la solution est centrifugée et déposée sur une colonne de Biogel P 60 (2,5 x 200 cm) équilibrée et éluée par le même tampon. Le débit de la colonne est de 27 ml/h et les fractions recueillies de 5,4 ml. Le diagramme d'éluion obtenu par lecture de la densité optique de chaque fraction à 220 nm est présenté dans la figure 8.

Nous obtenons 4 pics:

- le premier correspond à l'histone H2A
- le second correspond à l'histone H3
- le troisième correspond à l'histone H4
- le quatrième ne contient que le mercaptoéthanol

L'histone H4 obtenue est homogène en gel de polyacrylamide à pH 2,7 (PANYIM et CHALKLEY, 1969). Le rendement moyen est de 56 p.100.

2- Isolement de l'histone H2A à partir de la fraction F_{2a2}

La fraction F_{2a2} comporte, outre l'histone H2A, beaucoup d'histone H4 et de l'histone H3 (figure 7, gel n°3).

a- Chromatographie d'échanges d'ions sur Biorex 70

La séparation de ces 3 histones H2A, H3 et H4 est très satisfaisante selon la technique décrite par LUCK et *al.* (1958), technique déjà éprouvée au laboratoire pour la purification de l'histone H2A de thymus de Veau (SAUTIERE, 1973) et de tumeur de chloroleucémie du Rat (LAINE, 1974).

Nous
cette méthode pour
Ce travail est décr

Cepe
vaise qualité d'un
amenée à changer no
H2A.

b- C

La f
chromatographie de
conditions décrites
H4.

Le d
la densité optique
dans la figure 9. N

- le pic 1 cor
taminée par un peu
Le rendement est d'

- le pic 2 cor
H2A et H4 (figure 9

- le pic 3 cor
pure (figure 9, gel

- le pic 4 ne

L'hi
soumise à l'électro

c- A

d

L'ag
par KALTSCHMIDT et
protéines ribosomal
acrylamide (20 x 15
environ 10 mg de pr
8M. La concentratio
rèse sont analogues
lytique (17 p.100 e

CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION
DE LA FRACTION F_{2a1} SUR COLONNE
DE BIOGEL P 60

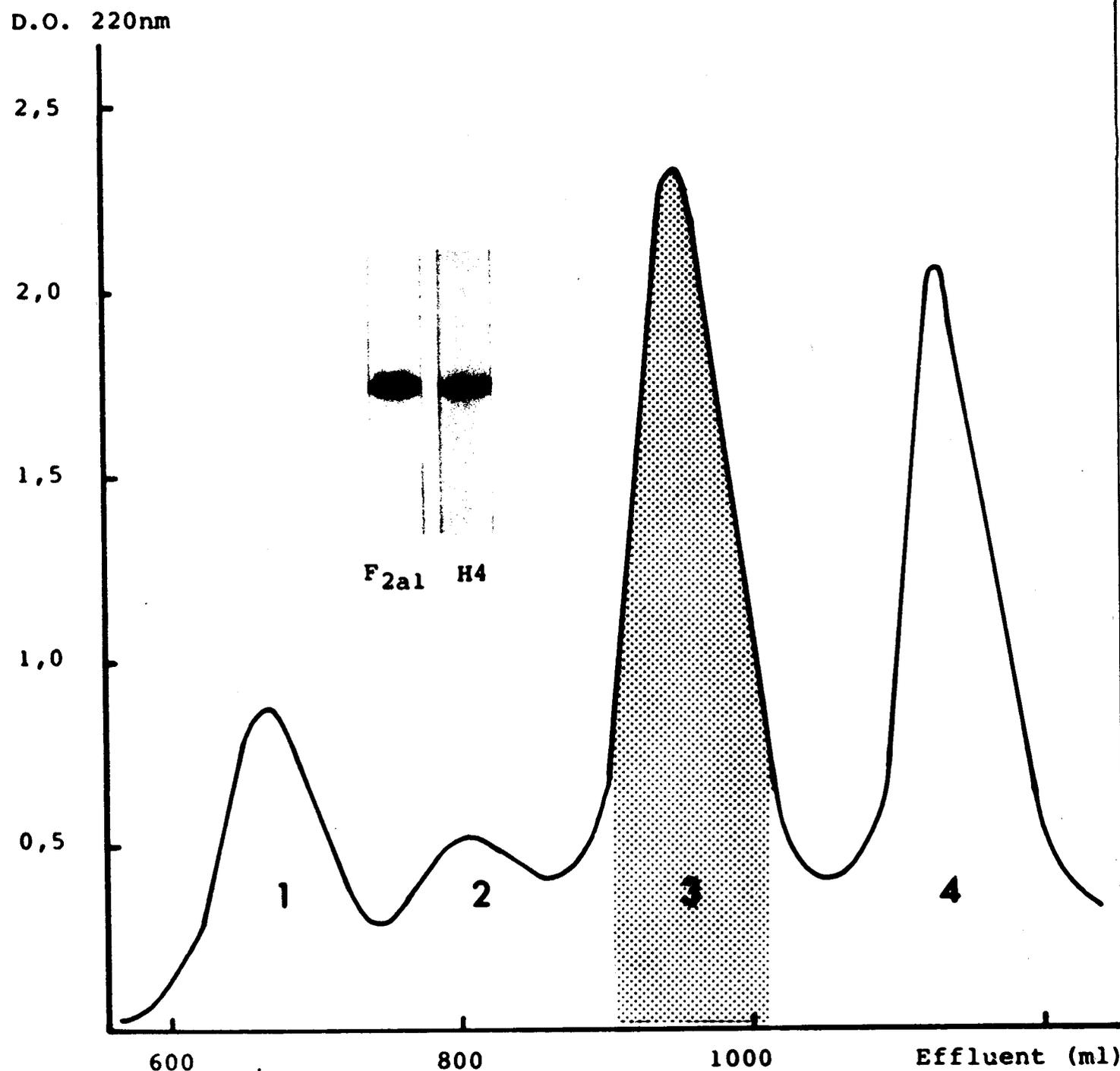


FIGURE 8

CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION DE
LA FRACTION F_{2a2} SUR COLONNE
DE BIOGEL P 60

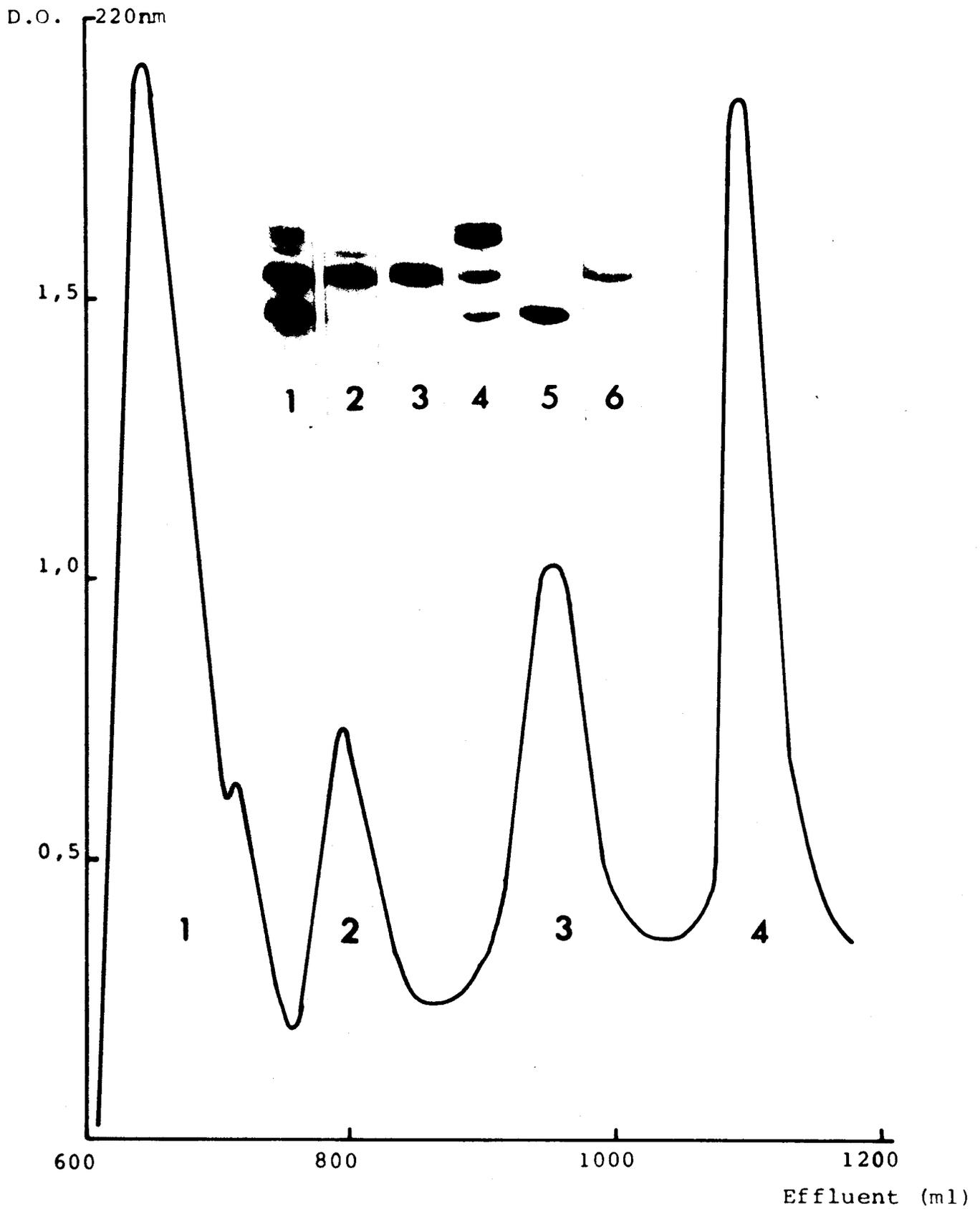


FIGURE 9



La migration est effectuée pendant 18 heures, sous un voltage constant de 100 volts, à la température du laboratoire.

Après révélation de deux bandes latérales (2 cm de large), les bandes centrales correspondant aux protéines sont découpées dans le gel et broyées dans 50 à 100 ml d'HCl 0,25N (Waring Blendor, basse vitesse, 15 secondes). L'extraction se poursuit pendant 1 heure, sous agitation et le surnageant est récupéré par centrifugation (Centrifugeuse Jouan, vitesse maximum). Deux fois encore, le sédiment est extrait par l'HCl 0,25N. Les trois surnageants rassemblés sont filtrés sur filtre Millipore (porosité 0,22 μ), dialysés pendant 48 heures contre de l'eau désionisée et lyophilisés.

L'histone H2A ainsi obtenue est électrophorétiquement pure (figure 9, gel n° 6), mais elle renferme un peu d'acrylamide qui est éliminé par chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 60 (colonne 60 x 2,5 cm), dans les mêmes conditions que précédemment.

Le diagramme d'élution obtenu par lecture de la densité optique de chaque fraction à 220 nm est présenté dans la figure 10. Nous pouvons remarquer la présence d'un petit pic (pic 1), correspondant à l'acrylamide, élué juste avant l'histone H2A (pic 2).

3- Isolement des histones H1 et H2B à partir de la fraction F₁ + F_{2b}

Malgré l'extraction de la fraction F₃ par l'éthanol-HCl, la fraction F₁ + F_{2b} contient encore de l'histone H3 (figure 7, gel n° 4). Ces 3 histones sont séparées par chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 60, suivie d'une électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide.

Nous avons préféré la chromatographie de gel-filtration à la précipitation différentielle à l'acétone, car la fraction F_{2b} ainsi obtenue nous a paru plus homogène et donc plus aisée à purifier par électrophorèse préparative.

ELIMINATION DE L'ACRYLAMIDE DE L'HISTONE H2A
PAR GEL FILTRATION SUR BIOGEL P 60

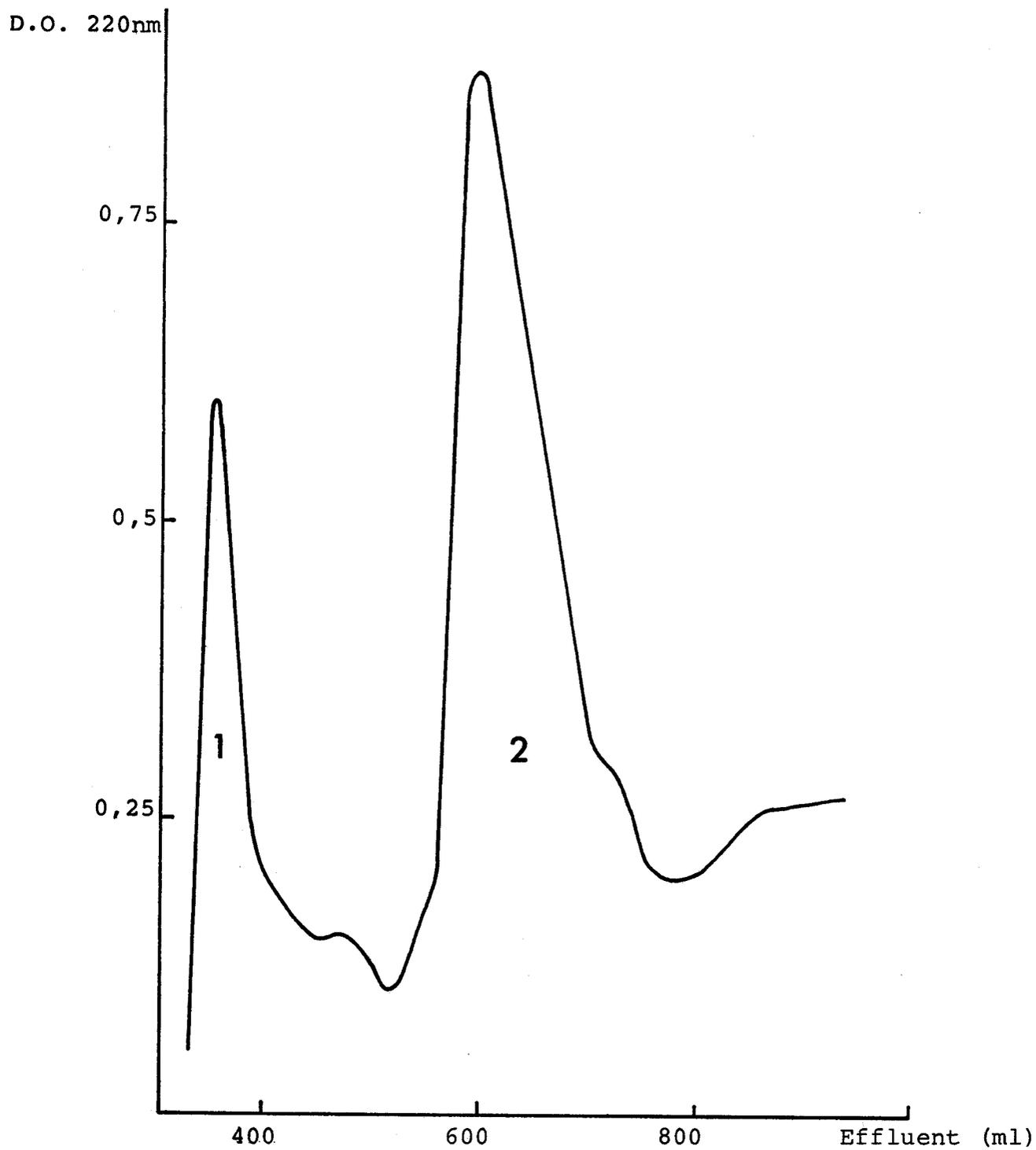


FIGURE 10



a- Chromatographie sur Biogel P 60

Nous avons utilisé une colonne de Biogel P 60 de 200 x 2,5 cm, dans les mêmes conditions que précédemment (voir p. 53).

Le diagramme d'élution obtenu par lecture de la densité optique de chaque fraction à 220 nm est présenté dans la figure 11. Nous pouvons observer 4 pics:

- les 2 premiers pics correspondent en fait à l'histone H1 (figure 11, gels n° 1 et 2)
- le pic 3 correspond à l'histone H2B contaminée par l'histone H3 (figure 11, gel n° 3)
- le pic 4 ne contient que le mercaptoéthanol.

Les fractions correspondant aux pics sont rassemblées et dialysées pendant 48 heures contre de l'eau désionisée, puis lyophilisées.

b- Purification de l'histone H2B

Le pic n° 3 de la figure 11, correspondant à l'histone H2B, contient, en quantité importante, de l'histone H3 et des traces d'histone H4 (gel n° 3). L'histone H2B et l'histone H3 sont séparées par électrophorèse préparative sur plaque de gel de polyacrylamide, réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

L'histone H2B est ensuite débarrassée de l'acrylamide par chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 60 (colonne 60 x 2,5 cm), comme il est pratiqué pour l'histone H2A. Le diagramme d'élution obtenu par lecture de la densité optique de chaque fraction à 220 nm est présenté dans la figure 12.

- le premier pic, élué très rapidement, correspond à l'acrylamide
- le deuxième pic correspond à l'histone H2B.

Les étapes de purification de l'histone H2B ont été contrôlées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (figure 13).

D.C. 220nm

CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION DE
LA FRACTION F₁ + F_{2b} SUR COLONNE
DE BIOGEL P 60

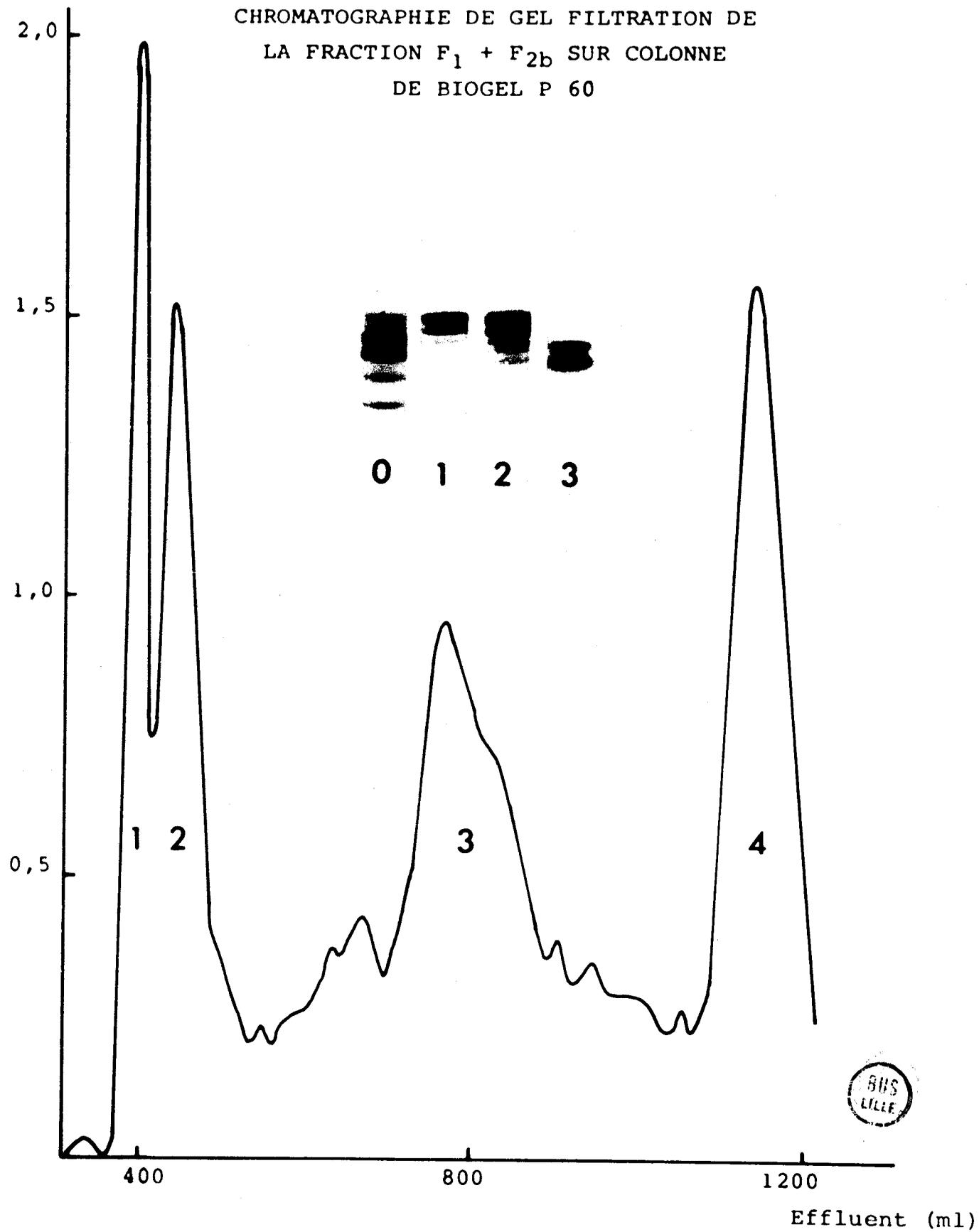


FIGURE 11

ELIMINATION DE L'ACRYLAMIDE DE L'HISTONE H2B
PAR GEL FILTRATION SUR BIOGEL P 60

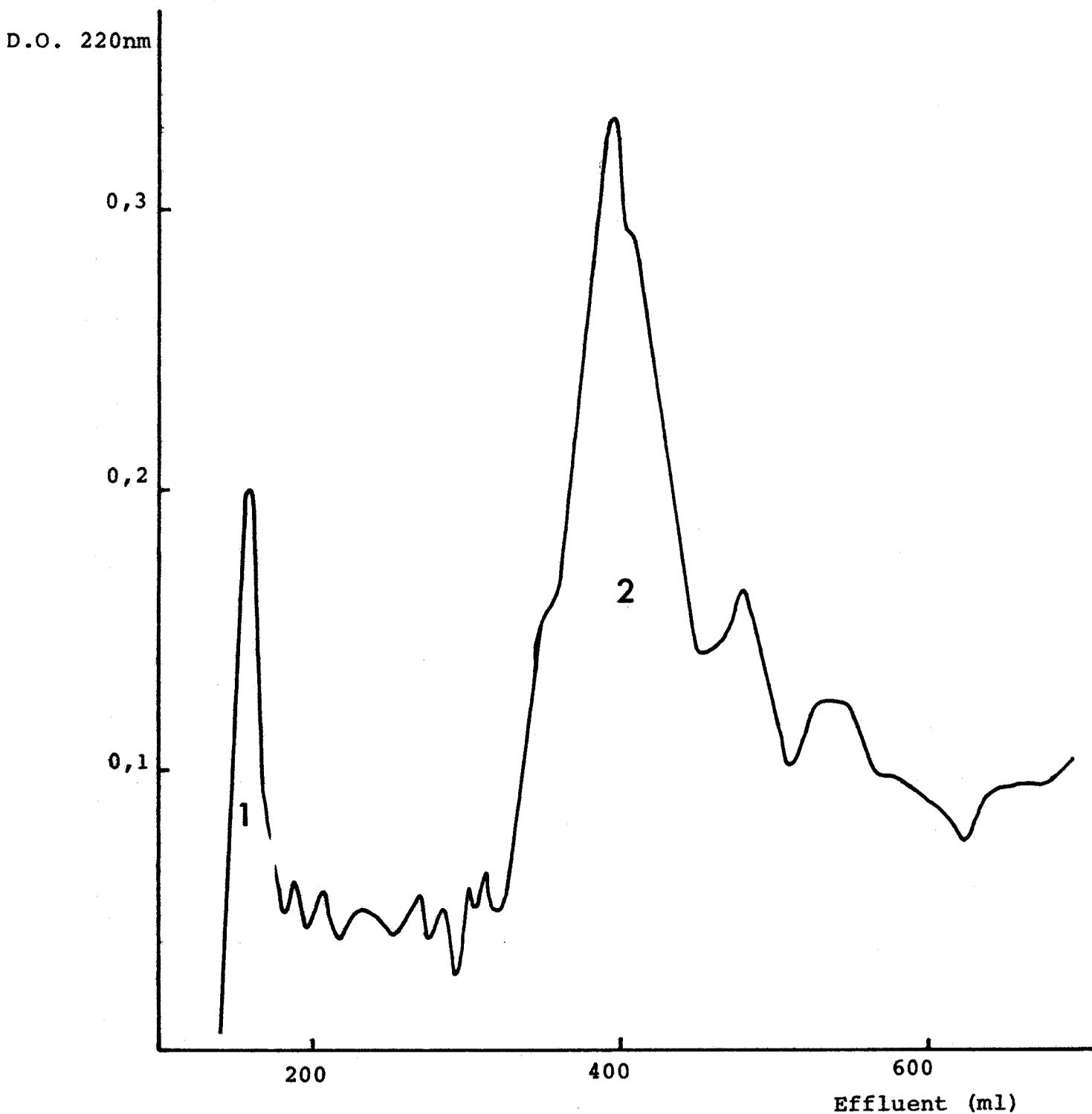


FIGURE 12



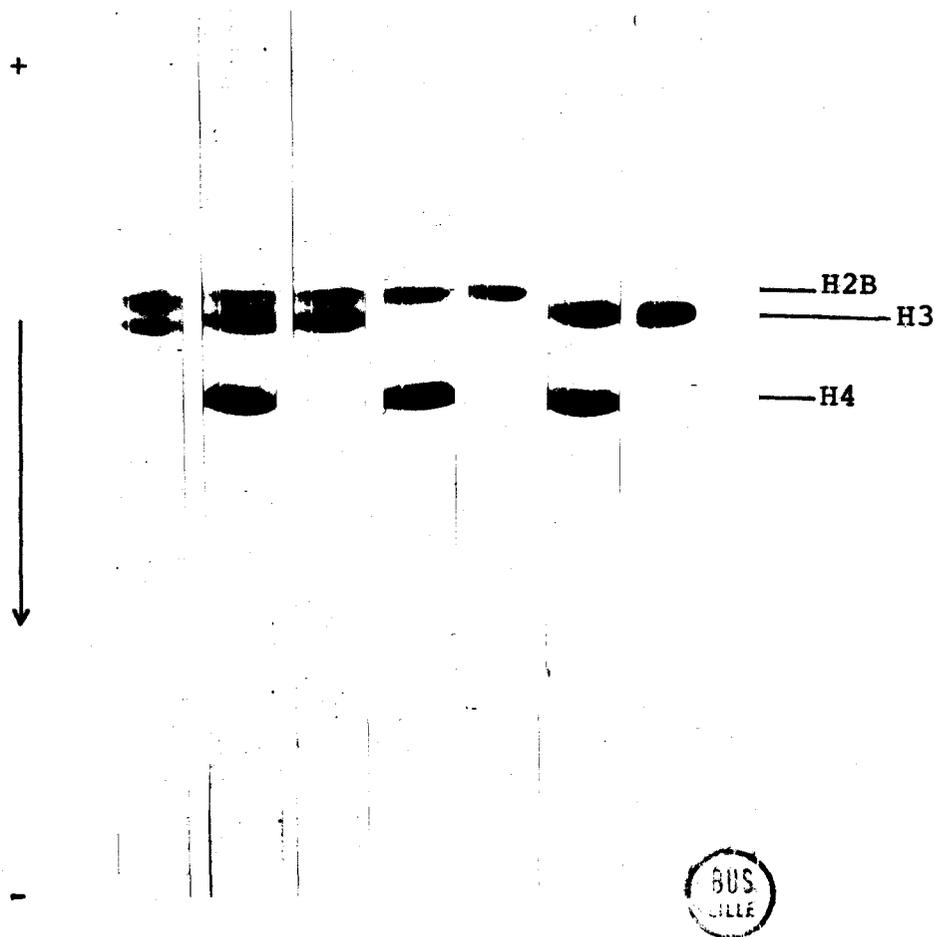


FIGURE 13

CONTROLE DES ETAPES DE PURIFICATION DE L'HISTONE H2B

Le gel n° 1 représente la fraction brute initiale $F_1 + F_{2b}$
 Les gels n° 2 et 3 représentent la fraction purifiée par
 gel filtration sur Biogel P 60 (pic n° 3 de la figure 11)
 Le gel n° 2 contient de l'histone H4 de thymus de Veau en
 témoin.

Les gels n° 4 et 5 représentent l'histone H2B et les gels
 n° 6 et 7 représentent l'histone H3 séparées en électropho-
 rèse préparative sur gel de polyacrylamide. Les gels n° 4
 et 6 contiennent de l'histone H4 de thymus de Veau en témoin.

c- Purification de l'histone H1

L'histone H1 obtenue par gel-filtration sur Biogel P 60 de la fraction $F_1 + F_{2b}$ comporte 2 bandes bien distinctes en gel de polyacrylamide (figure 11, gels n° 1 et 2).

Nous avons essayé, mais en vain, de séparer ces 2 formes d'histone H1 par électrophorèse préparative sur plaque de gel de polyacrylamide, puisqu'elles semblaient bien séparées en électrophorèse analytique. Les 2 bandes que nous observons en gel migrent sur les plaques en 1 seule bande très large.

Cependant, la fraction que nous avons obtenue par élution de cette large bande est purifiée : elle ne contient plus que les 2 bandes bien distinctes de l'histone H1 (figure 14).

4- Isolement de l'histone H3 à partir de la fraction F_{2a2}

Bien que lors de la purification de l'histone H2B, par électrophorèse préparative, il soit possible d'obtenir de l'histone H3 pure (figure 13, gels n° 6 et 7), c'est avant tout à partir de la fraction F_{2a2} que cette histone a été préparée. La fraction F_{2a2} contient, en effet, outre l'histone H2A, de l'histone H3 et de l'histone H4.

Par chromatographie de gel-filtration de la fraction F_{2a2} sur Biogel P 60 (voir p. 55), nous avons obtenu 4 pics, le second correspondant en majorité à l'histone H3, contaminée par H2A et H4 (figure 9, gel n° 4).

Les fractions correspondant à ce pic n° 2 ont été rassemblées, dialysées contre de l'eau désionisée et lyophilisées. Nous avons alors essayé de séparer H3, H2A et H4 par précipitation à l'acétone.

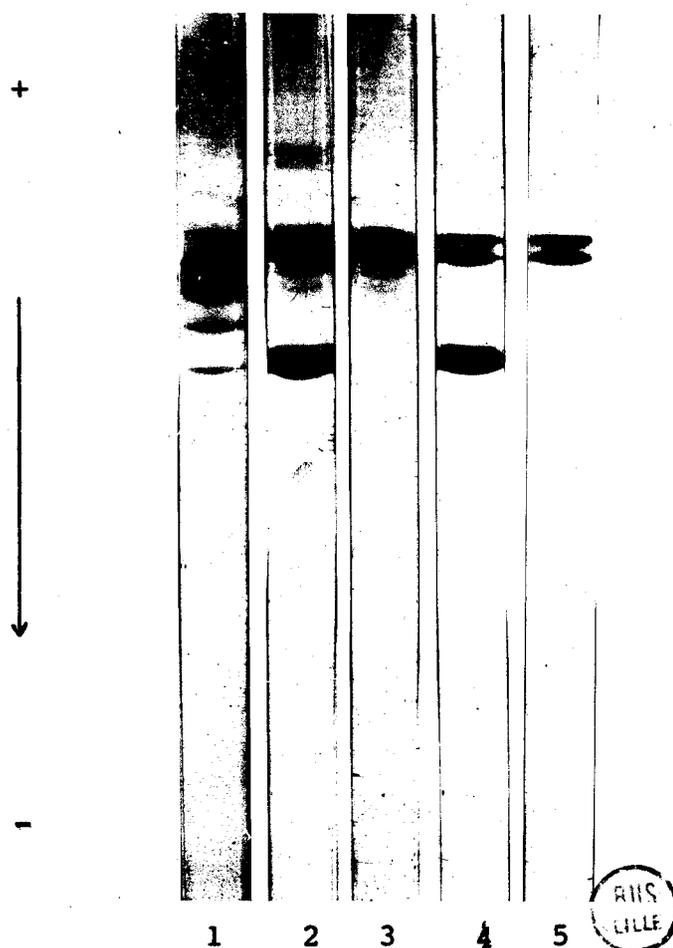


FIGURE 14

CONTROLE DES ETAPES DE PURIFICATION DE L'HISTONE H1

*Le gel n° 1 représente la fraction brute initiale $F_1 + F_{2b}$.
 Les gels n° 2 et 3 représentent le pic n° 2 de la figure 11.
 Les gels n° 4 et 5 représentent l'histone H1 purifiée par
 électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide. Les 2
 bandes observées sur les gels correspondent aux sous-fractions
 de l'histone H1.*

*Les gels n° 2 et 4 contiennent de l'histone H4 de thymus de
 Veau en témoin.*

75 mg de protéine (pic n° 2 de la figure 9, page 56) sont dissous dans 75 ml du mélange éthanol absolu-HCl 1,25N (4/1, v/v). La solution obtenue est filtrée sur filtre Millipore (porosité 0,45 μ) et additionnée de 0,8 volumes d'acétone.

La précipitation s'effectue à -20° C pendant 48 heures. Le sédiment est récupéré par centrifugation (Centrifugeuse Jouan, vitesse maximum) et dissous dans l'HCl 0,01N, dialysé contre de l'eau désionisée et lyophilisé. Il correspond à l'histone H3 électrophorétiquement pure (figure 15).

Quant au surnageant, il contient les histones H2A et H4 qui sont précipitées par addition de 2 volumes supplémentaires d'acétone. Elles sont séparées par la suite en chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 60.



FIGURE 15

CONTROLE DES ETAPES DE PURIFICATION DE L'HISTONE H3

Le gel n° 1 représente la fraction brute F_{2a2}

Le gel n° 2 représente le pic n° 3 de la figure 9

Les gels n° 3 et 4 représentent l'histone H3 obtenue par précipitation sélective à l'acétone.

Le gel n° 3 contient de l'histone H4 de thymus de Veau en témoin.

II- CARACTERISATION DES HISTONES DE GONADE D'OURSIN

Les histones de gonade d'Oursin ont été caractérisées par leur migration électrophorétique en gel de polyacrylamide, par leur composition en acides aminés et par la détermination de leurs acides aminés NH₂- (dansylation) et COOH-terminaux (hydrolyse par les carboxypeptidases).

A) Electrophorèse analytique en gel de polyacrylamide

La technique utilisée est celle décrite par PANYIM et CHALKLEY (1969). L'électrophorèse est effectuée à pH 2,7, en milieu urée 2,5M - acide acétique 0,9M avec une concentration en acrylamide de 17 p.100.

Nous avons pu séparer très facilement, dans ces conditions, les 5 histones isolées des gonades de l'Oursin (figures 16 A et B). Elles migrent dans l'ordre suivant, de l'anode vers la cathode :

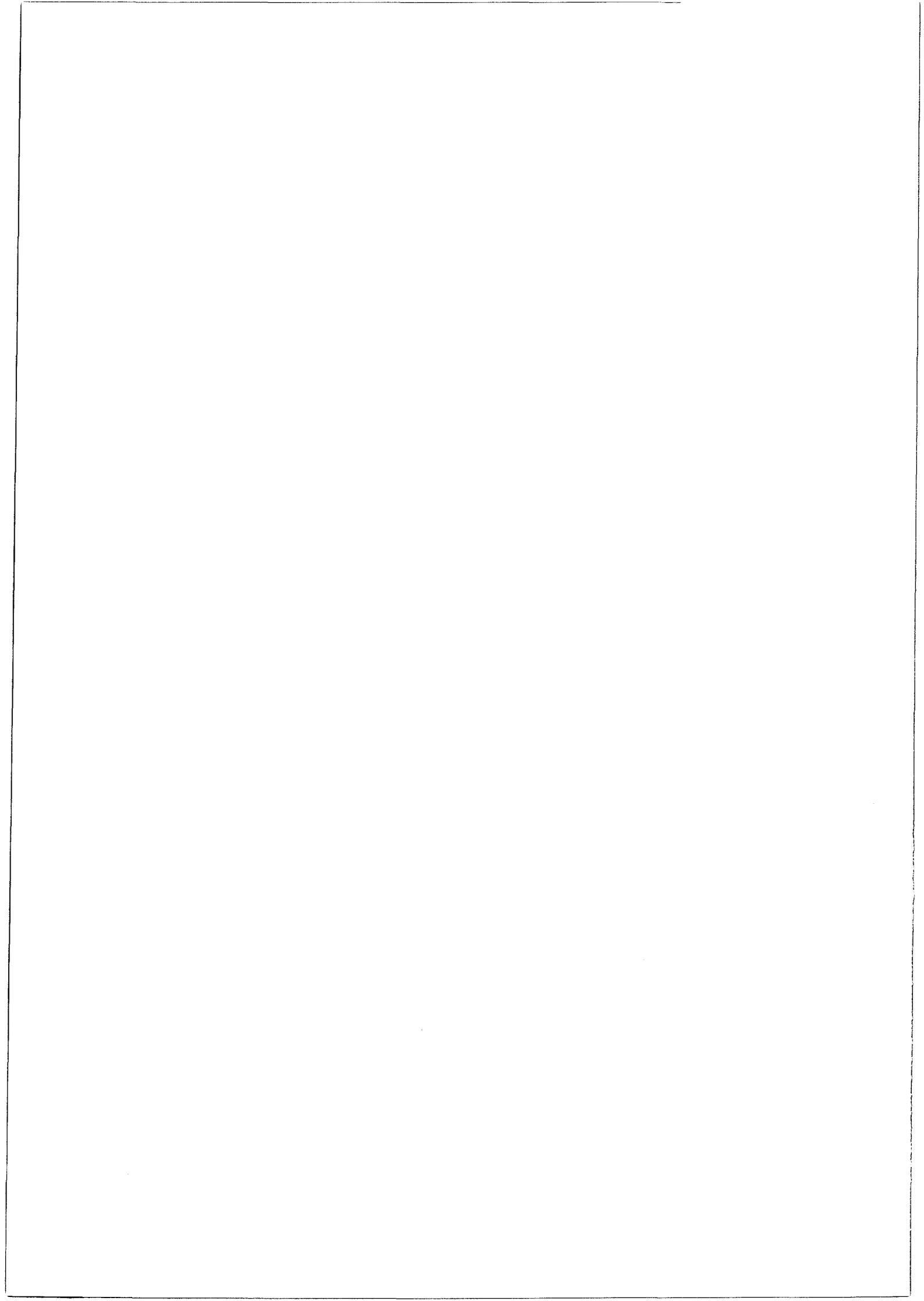
1- Histone_H1 (gels n° 3 et 4, fig. 16 A)

Elle se présente, chez l'Oursin, sous forme de 2 bandes bien distinctes, d'égale intensité, alors que chez le Veau, on ne trouve qu'une seule bande.

Nous pouvons remarquer que la bande la plus lente migre légèrement en arrière de la H1 de thymus de Veau.

2- Histone_H2B (gels n° 5 et 6, fig. 16 A)

L'histone H2B de gonade d'Oursin a une migration beaucoup plus anodique que l'histone H2B de thymus de Veau. Elle migre en arrière de l'histone H3, alors que chez le Veau, la H2B migre entre l'histone H3 et l'histone H2A. Cette différence de migration est le reflet d'une différence importante dans la composition en acides aminés de cette protéine, comme nous le verrons ultérieurement.



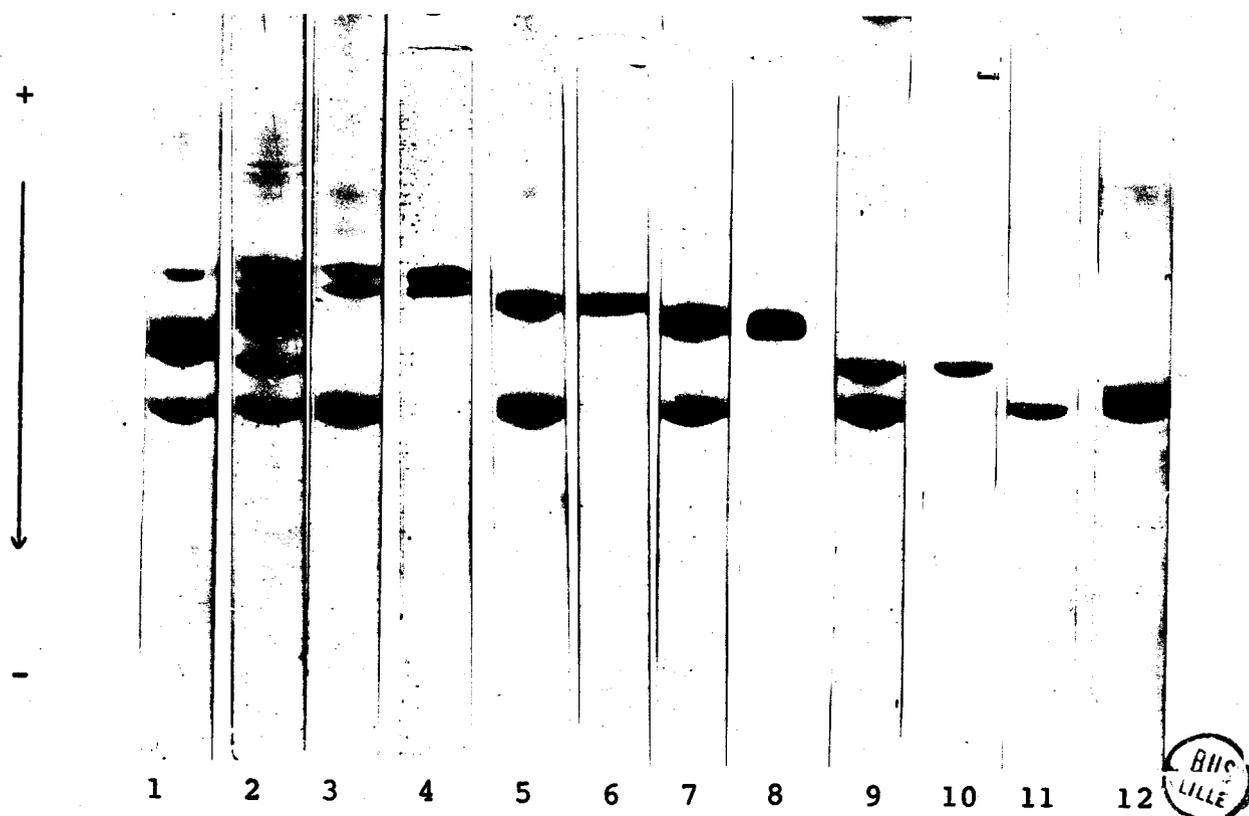


FIGURE 16 A

**SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DES HISTONES
DE GONADE D'OURSIN**

Gels : 12 x 0,6 cm

Dépôt : 10 µg de protéine

*Migration : 4 heures sous un ampérage constant de 1,5 mA
par tube*

*Coloration : 30 minutes dans l'Amidoschwarz 10 B à 1 p.100
dans le solvant Acide acétique/Ethanol/Eau
(7:20:73) (v/v)*

Décoloration dans le même solvant

Gel n° 1 : Histones totales de thymus de Veau

Gel n° 2 : Histones totales de gonade d'Oursin

Gels n° 3 et 4 : Histone H1 de gonade d'Oursin

Gels n° 5 et 6 : Histone H2B de gonade d'Oursin

Gels n° 7 et 8 : Histone H3 de gonade d'Oursin

Gels n° 9 et 10 : Histone H2A de gonade d'Oursin

Gel n° 11 : Histone H4 de gonade d'Oursin

Gel n° 12 : Histone H4 de thymus de Veau

Les gels n° 3, 5, 7 et 9 contiennent de l'histone H4 de gonade d'Oursin en témoin.

De plus, l'histone H2B d'Oursin montre 2 bandes très rapprochées, ce qui pourrait traduire soit une microhétérogénéité dans la protéine, soit l'existence de 2 sous-fractions H2B, comme cela a été signalé chez l'Oursin *Parechinus angulosus* par STRICKLAND et al. (1974b), soit enfin une différence dans les taux d'acétylation ou de phosphorylation de la protéine.

3- Histone_H3 (gels n° 7 et 8, fig. 16 A)

L'histone H3 de gonade d'Oursin migre au même niveau que l'histone H3 de thymus de Veau. Cependant, avec une concentration très faible de protéine, nous voyons apparaître 2 bandes très rapprochées. Ceci peut être le reflet d'une microhétérogénéité dans la protéine, ou encore d'une différence dans le taux d'acétylation de cette protéine.

4- Histone_H2A (gels n° 9 et 10, fig. 16 A)

L'histone H2A de gonade d'Oursin migre un peu plus loin que l'histone H2A de thymus de Veau, en une seule bande. Ceci traduit une différence importante dans la composition en acides aminés de la protéine (voir tableau XI).

5- Histone_H4 (gels n° 11 et 12, fig. 16 A)

L'histone H4 d'Oursin (gel n° 11) migre au même niveau que l'histone H4 de Veau, en une bande majeure et une bande mineure, un peu moins rapide, que l'on ne distingue pas nettement sur la photo du gel.

Par contre, l'histone H4 de Veau (gel n° 12) migre en 3 bandes dont 2 d'égale intensité et la troisième faiblement colorée et de migration plus lente.

La bande la plus rapide migre au même niveau que la bande majeure de l'histone H4 d'Oursin. Elle correspond à la protéine non acétylée. La seconde bande, d'égale intensité, correspond à la protéine monoacétylée : la bande mineure observée dans l'histone H4 d'Oursin a une migration identique.

Nous verrons dans le chapitre suivant que l'étude de la structure primaire de l'histone H4 d'Oursin nous a permis de déterminer le taux d'acétylation du résidu de lysine

en position 16. Ce taux est de 20 p.100 chez l'Oursin alors qu'il est de 50 p.100 chez le Veau.

La troisième bande observée dans l'histone H4 de Veau correspond à la forme diacétylée de la protéine.

B) Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés des 5 histones que nous avons isolées des gonades de l'Oursin ont été établies après hydrolyse des protéines par l'HCl 6N, à 110° C, en tubes scellés, sous vide, pendant 24 heures et 72 heures.

Elles sont présentées dans les tableaux VIII, IX, X et XI, en comparaison avec les compositions en acides aminés des histones homologues du thymus de Veau.

1- Histone H1

La composition en acides aminés de l'histone H1 de gonade d'Oursin est présentée dans le tableau VIII. Bien que cette composition ait été établie sur l'ensemble des sous-fractions constituant l'histone H1 d'Oursin, nous pouvons faire les remarques suivantes :

- Les histones H1 d'Oursin sont riches en lysine (25 p.100 des résidus) comme l'histone H1 de Veau.

- La différence essentielle qui les caractérise est la présence de méthionine et d'histidine, acides aminés absents de l'histone H1 de Veau. PAOLETTI et HUANG (1969) avaient signalé ce fait à propos de l'histone H1 de l'Oursin *Arbacia punctulata* (tableau IV, p. 35).

- Les histones H1 d'Oursin sont aussi beaucoup plus riches en arginine que l'histone H1 de Veau : 8 p.100 des résidus au lieu de 1,9 p.100. Le rapport lysine/arginine qui caractérise ces histones est donc beaucoup plus proche de celui de l'histone H5 spécifique des érythrocytes de Poulet, que de celui de l'histone H1 de thymus de Veau. Ce résultat concorde avec les observations réalisées chez d'autres Echinodermes (voir chapitre I).

TABLEAU VIII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H1 ISOLEE
DES GONADES DE L'OURSIN *PSAMMECHINUS MILIARIS*

(exprimée en résidus pour 100 résidus d'acides aminés)

ACIDES AMINES	OURSIN	VEAU KINKADE et COLE (1966)
Acide aspartique	1,99	1,88
Thréonine	3,49	5,17
Sérine	8,88	6,11
Acide glutamique	4,08	3,29
Proline	6,32	9,40
Glycine	5,73	6,11
Alanine	24,57	26,32
Valine	3,84	5,17
Méthionine	1,52	--
Isoleucine	1,41	0,94
Leucine	2,35	3,76
Tyrosine	0,79	0,47
Phénylalanine	0,51	0,47
Histidine	1,62	--
Lysine	24,84	28,67
Arginine	8,05	1,88
Total	99,99	99,64
Rapport Lys/Arg	3,08	15,20
Rapport Basiques/Acides	5,69	5,90
NH ₂ -terminal	Bloqué	Acétyl-Sérine
COOH-terminal	Ser, Lys	Lysine

- Les histones H1 d'Oursin sont aussi moins riches en proline que l'histone H1 de thymus de Veau. SUBIRANA (1970) avait aussi noté le faible taux de proline dans l'histone H1 de l'Holothurie *Holothuria tubulosa*.

La comparaison de nos résultats avec la composition de l'histone H1 isolée de l'Etoile de Mer *Asterias rubens* par VANHOUTTE-DURAND (1975) montre certaines différences :

- L'histone H1 d'Oursin est moins riche en lysine et plus riche en arginine que l'histone H1 d'Etoile de Mer.

- Elle est aussi plus riche en sérine.

- Par contre, l'histone H1 d'Etoile de Mer montre la présence, comme l'histone H1 d'Oursin, de méthionine et d'histidine et d'un faible taux de proline.

2- Histone H2B

La composition en acides aminés de l'histone H2B d'Oursin est présentée dans le tableau IX.

L'histone H2B d'Oursin a une composition caractéristique des histones de type H2B : elle est riche en sérine (13 p.100 des résidus), elle a un faible taux de leucine (4,5 p.100 des résidus) et l'acide aminé NH₂-terminal a été identifié à la proline. Ces 3 critères la rapprochent de l'histone H2B du thymus de Veau.

Toutefois, elle s'en distingue fondamentalement par sa richesse en arginine (14,5 p.100 au lieu de 6,5 p.100) et son rapport lysine/arginine de 0,69. Ce rapport est caractéristique des histones riches en arginine ($R < 1$). L'histone H2B de thymus de Veau est riche en lysine et son rapport lysine/arginine est de 2,5.

L'histone H2B d'Oursin est aussi beaucoup plus riche en glycine que l'histone H2B de Veau, et moins riche en alanine et tyrosine.

TABLEAU IX

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H2B ISOLEE
DES GONADES DE L'OURSIN *PSAMMECHINUS MILIARIS* (P. M.)

(exprimée en résidus pour 100 résidus d'acides aminés)

Les compositions en acides aminés des histones H2B de l'Oursin *Parrechinus angulosus* (P. A.), de l'Etoile de Mer *Asterias rubens* (A. R.) et du thymus de Veau (T. V.) sont données en comparaison.

ACIDES AMINES	P. M.	P. A. STRICKLAND et <i>al.</i> (1974b)	A. R. VANHOUTTE- DURAND (1975)	T. V. IWAI et <i>al.</i> (1970)
Acide aspartique	4,73	3,60	5,30	4,80
Thréonine	6,49	7,44	6,74	6,40
Sérine	12,77	9,53	7,09	11,20
Acide glutamique	6,96	6,60	8,05	8,00
Proline	5,07	5,84	4,27	4,80
Glycine	10,40	9,09	7,11	5,60
Alanine	7,36	7,21	10,28	10,40
Valine	7,16	6,81	6,28	7,20
Méthionine	1,35	1,47	2,44	1,60
Isoleucine	3,65	3,26	5,82	4,80
Leucine	4,46	4,49	4,55	4,80
Tyrosine	2,70	3,40	4,15	4,00
Phénylalanine	1,28	1,68	1,36	1,60
Histidine	1,35	1,46	2,42	2,40
Lysine	10,00	11,00	15,64	16,00
Arginine	14,46	17,14	8,51	6,40
Total	100,19	100,02	100,01	100,00
Rapport Lys/Arg	0,69	0,64	1,83	2,50
Rapport Bas/Ac	2,21	2,90	1,99	1,93
NH ₂ -terminal	Proline			Proline
COOH-terminal	Arginine			Lysine

L'histone H2B d'Oursin est, par contre, très proche des 2 histones H2B isolées par STRICKLAND et *al.* (1974b), chez l'Oursin *Parechinus angulosus* (tableau IX) qui sont également des protéines très riches en arginine et sérine et d'un poids moléculaire supérieur à celui de l'histone H2B de Veau (20 résidus de plus).

Ce dernier fait pourrait expliquer la migration plus anodique de l'histone H2B d'Oursin en gel de polyacrylamide.

Les caractéristiques de ces histones H2B semblent être particulières à la classe des Echinides, car l'histone H2B isolée de l'Etoile de Mer est en fait beaucoup plus proche de l'histone H2B de Veau que de l'histone H2B d'Oursin (tableau IX).

3- Histone H3

La composition en acides aminés de l'histone H3 de gonade d'Oursin est présentée dans le tableau X.

Bien que l'on puisse observer certaines différences au niveau des taux de thréonine, sérine, glycine et lysine, cette composition est très proche de celle de l'histone H3 de thymus de Veau. Elle est aussi très proche de la composition en acides aminés de l'histone H3 de l'Oursin *Parechinus angulosus*.

Ces résultats semblent confirmer la grande stabilité observée pour cette protéine à travers l'évolution des espèces.

4- Histone H2A

La composition en acides aminés de l'histone H2A d'Oursin est présentée dans le tableau XI.

Elle présente de nombreuses différences, par rapport à celle de l'histone H2A de thymus de Veau. Les plus marquées se situent au niveau des taux de thréonine, de sérine, de phénylalanine et d'histidine.

En effet, nous pouvons observer 2 résidus de phénylalanine et 2 résidus d'histidine au lieu de 1 et 4 respectivement chez le

TABLEAU X

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H3 ISOLEE
DES GONADES DE L'OURSIN *PSAMMECHINUS MILIARIS* (P. M.)

(exprimée en nombre de résidus par mole de protéine)

Les compositions en acides aminés des histones H3 de l'Oursin *Psammechinus angulosus* (P. A.) et du thymus de Veau (T. V.) sont données en comparaison.

ACIDES AMINES	P. M.	P. A. BRANDT et <i>al.</i> (1974)	T. V. DELANGE et <i>al.</i> (1972)
Acide aspartique	5	5	5
Thréonine	8	10	10
Sérine	7	6	5
Acide glutamique	16	15	15
Proline	6	6	6
Glycine	10	7	7
Alanine	17	18	18
1/2 Cystine	1	1	2
Valine	7	6	6
Méthionine	2	2	2
Isoleucine	7	7	7
Leucine	12	12	12
Tyrosine	3	3	3
Phénylalanine	4	4	4
Histidine	2	2	2
Lysine	15	13	11
Arginine	16	18	18
ϵ -NH ₂ -Méthyllysine			2
Nombre de résidus	138	135	135
Rapport Lys/Arg	0,94	0,72	0,72
Rapport Basiques/Acides	2,90	1,65	1,65
NH ₂ -terminal	Ala		Ala
COOH-terminal	Ser		Ala



TABLEAU XI

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H4 ISOLEES
DES GONADES DE L'OURSIN *PSAMMECHINUS MILIARIS*

(exprimée en nombre de résidus par mole de protéine.

Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de résidus arrondis à l'entier le plus proche.)

ACIDES AMINES	HISTONE H2A		HISTONE H4	
	OURSIN	VEAU SAUTIERE et <i>al.</i> (1974)	OURSIN	VEAU DELANGE et <i>al.</i> (1968)
Acide aspartique	8,9 (9)	8,5 (8)	5,0 (5)	5,0 (5)
Thréonine	3,2 (3)	5,0 (5)	5,3 (6)*	7,1 (7)
Sérine	7,1 (7)	4,1 (4)	2,2 (2)	2,2 (2)
Acide glutamique	10,4 (9)*	12,2 (12)	6,7 (6)*	6,38 (6)
Proline	5,6 (5)	5,3 (5)	1,4 (1)	1,1 (1)
Glycine	16,3 (15)*	14,0 (14)	17,0 (17)	16,4 (17)*
Alanine	18,3 (17)*	16,3 (16)	7,3 (7)	7,43 (7)
1/2 Cystine	-	-	0,5 (1)	-
Valine	8,3 (8)	8,0 (8)	9,1 (9)	8,86 (9)
Méthionine	-	-	0,9 (1)	1,0 (1)
Isoleucine	5,9 (6)	5,6 (6)	5,7 (6)	5,91 (6)
Leucine	15,9 (15)*	15,7 (16)	8,2 (8)	8,05 (8)
Tyrosine	3,1 (3)	2,9 (3)	3,9 (4)	3,7 (4)
Phénylalanine	2,0 (2)	1,2 (1)	2,0 (2)	2,0 (2)
Histidine	2,1 (2)	3,9 (4)	1,9 (2)	1,9 (2)
Lysine	13,2 (13)	13,6 (14)	10,2 (10)	9,81 (10)
Arginine	11,2 (11)	12,0 (12)	13,7 (14)	13,9 (14)
ϵ -NH ₂ -Méthyllysine			0,7 (1)	0,91 (1)
Nombre de résidus	125	129	102	102
Rapport Lys/Arg	1,18	1,16	0,80	0,78
Rapport Bas/Ac	1,37	1,50	2,26	2,45
NH ₂ -terminal	Ac-Ser	Ac-Ser	Ac-Ser	Ac-Ser
COOH-terminal	Lysine	Lysine	Glycine	Glycine

* Valeurs retenues d'après les études structurales.



Veau. La délétion de 2 résidus d'histidine a également été signalée par BAILEY et DIXON (1973) dans l'histone H2A de Truite et par VANHOUTTE-DURAND (1975) dans l'histone H2A d'Etoile de Mer.

Nous pouvons remarquer aussi l'absence de cystéine et de méthionine, comme dans l'histone H2A de Veau, tandis que la méthionine est présente dans l'histone H2A d'Etoile de Mer.

D'autre part, la protéine ne contient que 125 résidus, ce qui met en évidence 4 délétions par rapport à l'histone homologue de Veau. Néanmoins, les rapports lysine/arginine et basiques/acides sont très proches de ceux de l'histone H2A de Veau.

Les différences que nous pouvons remarquer dans la composition en acides aminés de cette protéine permettent de penser que la structure primaire de l'histone H2A est moins conservative que ne l'est la structure primaire de l'histone H4.

5- Histone_H4

La composition en acides aminés de l'histone H4 d'Oursin (tableau XI) est pratiquement identique à celle de l'histone H4 de thymus de Veau. Mais il faut noter la présence d'un résidu de cystéine et la perte d'un résidu de thréonine.

La présence de cystéine dans l'histone H4 semble être une caractéristique particulière aux Echinodermes (SUBIRANA, 1971; STRICKLAND, 1974a). Cet acide aminé est absent de l'histone H4 de Pois (DELANGÉ et *al.*, 1969) et de l'histone H4 de Seiche (D. WOUTERS, observation non publiée).

Nous avons donc isolé et caractérisé chacune des 5 histones présentes chez l'Oursin *Psammechinus miliaris*. Nos résultats nous ont montré que les histones H4 et H3 étaient très proches des histones homologues du thymus de Veau. Par contre, les différences sont beaucoup plus accentuées pour les histones H2A, H2B et H1.

Après ces travaux d'isolement et de caractérisation, une étude structurale des histones H2A et H4 a été entreprise, qui sera présentée dans les chapitres III et IV de

notre mémoire.

Les raisons de ce choix relèvent de l'orientation générale de notre laboratoire qui s'est surtout spécialisé dans les études structurales comparatives des histones H2A et H4, études pour lesquelles nous disposons d'une méthodologie bien au point.

A cela, il faut ajouter que l'isolement de ces 2 histones ne présente aucune difficulté majeure.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H4 ISOLEE

DES GONADES DE L'OURSIN *PSAMMECHINUS MILIARIS*

I- STRATEGIE

II- DESCRIPTION DES METHODES UTILISEES

III- RESULTATS

I- STRATEGIE

L'histone H4 a été la première histone dont la séquence a été établie chez le Veau (DELANGE et *al.*, 1969a; OGAWA et *al.*, 1969). Depuis, la séquence de l'histone H4 a été déterminée dans d'autres organismes tels que le Pois (DELANGE et *al.*, 1969b) et le Porc (SAUTIERE et *al.*, 1970; 1971a) ainsi que dans des tissus cancéreux: hépatome de Novikoff (WILSON et *al.*, 1970), tumeur de chloroleucémie du Rat (SAUTIERE et *al.*, 1971b). Toutes ces études ont démontré une remarquable conservation de la séquence en acides aminés de cette protéine à travers l'évolution des espèces, puisque l'histone H4 de Veau ne diffère de celle de Pois que par le remplacement d'un résidu d'isoleucine, en position 60, par un résidu de valine et par le remplacement d'un résidu d'arginine, en position 77, par un résidu de lysine, substitutions essentiellement conservatives.

La composition de l'histone H4 d'Oursin (tableau XI) est pratiquement identique à celle de l'histone H4 de Veau. Elle en diffère cependant par la présence d'une cystéine et la perte d'une thréonine.

Comme l'histone homologue de Veau, l'histone H4 d'Oursin contient 10 résidus de lysine et 14 résidus d'arginine. Nous avons donc adopté la stratégie suivante pour la détermination de la structure primaire de la protéine.

a) Oxydation performique pour bloquer la fonction SH de la cystéine et donc éviter la formation de ponts disulfure et pour faciliter le dosage de l'acide aminé en évitant sa destruction pendant l'hydrolyse acide.

b) Maléylation de la protéine oxydée afin de bloquer les fonctions ε aminées de la lysine et limiter l'action de la trypsine aux seules liaisons arginyles. Ceci permet d'obtenir un moins grand nombre de peptides tryptiques (15, théoriquement, au lieu de 25).

c) Hydrolyse tryptique de la protéine oxydée et maléylée. L'étude des peptides tryptiques des histones riches en arginine est en effet la base des études comparatives réalisées au laboratoire.

d) Coupure à l'acide acétique 0,25N de la protéine native afin d'obtenir de larges fragments, la molécule ne comprenant que 5 résidus d'acide aspartique, dont 2 sous forme amide. L'obtention de ces fragments permet les recouvrements avec les peptides tryptiques.

La structure primaire de l'histone H4 de gonade d'Oursin a donc été déduite en premier lieu de l'étude des peptides tryptiques de la protéine oxydée et maléylée. L'alignement des peptides a pu être réalisé grâce aux recouvrements fournis par les peptides acétiques et la comparaison des peptides tryptiques avec ceux de l'histone H4 de Veau.

II- DESCRIPTION DES METHODES UTILISEES

A) Oxydation performique

L'oxydation performique est utilisée pour rompre les ponts disulfure. Dans le cas de l'histone H4 qui ne contient qu'un résidu de cystéine, l'oxydation de la protéine empêche la formation de dimères et facilite l'identification du peptide contenant la cystéine transformée en acide cystéique.

Nous avons utilisé la méthode décrite par HIRS (1967) qui emploie comme agent d'oxydation un mélange de 5 volumes d'eau oxygénée à 30 p.100 et de 95 volumes d'acide formique à 99 p.100. Le mélange est laissé 2 heures à température ambiante, au bout desquelles le réactif performique présente un maximum d'activité.

L'histone H4 de gonade d'Oursin (9 μ moles) est dissoute dans un mélange de 5 ml d'acide formique à 99 p.100 et 1 ml de méthanol. La solution de protéine et la solution performique sont refroidies séparément à 0° C pendant 30 minutes. Elles sont ensuite mélangées.

Après 150 minutes de réaction à température ambiante, le mélange réactionnel est dilué avec 400 ml d'eau distillée à 0° C et lyophilisé.

B) Maléylation

La protéine oxydée a été maléylée suivant la technique de BUTLER et *al.* (1969).

100 mg d'histone H4 oxydée (environ 9 μ moles) sont dissous dans 30 ml d'eau distillée. La solution est maintenue à 0° C dans un bain thermostaté. Elle est ajustée à pH 9,0 par addition de NaOH 2N à l'aide d'un pH-stat (Metröhm).

On ajoute peu à peu 198 mg d'anhydride maléique (10 μ moles d'anhydride maléique par μ mole de lysine, thréonine, sérine et tyrosine).

Le pH est maintenu à 9,0 durant la maléylation. Après la maléylation, le mélange réactionnel est dialysé pendant 4 heures contre 4 x 1l de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1M de pH 8,0.

C) Hydrolyse trypsique et démaléylation

La protéine oxydée et maléylée est alors hydrolysée en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1M, pendant 2 heures, à 37° C et à pH 8,0, par la TPCK-trypsine (le TPCK ou Tosyl-Phénylalananyl-Chlorométhylcétone est un inhibiteur de la chymotrypsine).

1 mg de TPCK-trypsine est ajouté au temps 0 de l'hydrolyse et 1 mg au bout d'une heure. Le rapport final enzyme/substrat est donc de 1/50.

Après 2 heures d'hydrolyse, la réaction est arrêtée par acidification du milieu jusque pH 3,5 à l'aide d'acide formique à 70 p.100 (v/v) et la démaléylation est effectuée pendant 40 heures à 40° C et pH 3,5 selon la technique décrite par DELANGE et *al.* (1969a) en présence de 2 gouttes de toluène afin d'éviter le développement des micro-organismes. L'hydrolysate est alors lyophilisé.

D) Fractionnement de l'hydrolysate par chromatographie d'échanges d'ions

L'hydrolysate est dissous dans 3 ml d'acide formique à 30 p.100 (v/v) et la fraction insoluble est éliminée par centrifugation.

La fraction soluble est alors déposée sur une colonne (95 x 0,635 cm) de résine échangeuse d'ions de type DOWEX 50 x 2 (résine Chromobeads P, Technicon). La colonne est thermostatée à 60° C et la résine est équilibrée en tampon pyridine-acide formique 0,1M de pH 2,9.

L'élution des peptides est réalisée par un gradient continu de tampons volatils à base de pyridine: molarité de la pyridine 0,1M à 2M, pH du tampon 2,9 à 5,0. La composition du gradient est indiquée dans le tableau XII.

Après le passage du gradient, la colonne est lavée pendant 24 heures avec un tampon pyridine 2M-acide acétique de pH 5,0 pour éluer les peptides les plus basiques.

Le débit de la colonne est maintenu constant à 33 ml/h à l'aide d'une pompe MILTON-ROY et des fractions de 5,5 ml sont collectées automatiquement.

Le repérage des peptides dans l'éluat s'effectue à l'aide de la réaction à la ninhydrine sur des aliquotes prélevées automatiquement. La réaction de Sakaguchi a été également utilisée pour le repérage des peptides contenant de l'arginine.

Les fractions qui correspondent aux pics du diagramme d'élution sont rassemblées et lyophilisées à l'aide d'un Rotary Evapomix (Büchler).

E) Contrôle d'homogénéité et purification des fractions peptidiques

Chaque fraction lyophilisée est dissoute dans 2 ml d'acide acétique à 10 p.100 (environ 4 μ moles par ml). Une aliquote de chaque fraction est déposée sur papier Whatman 3 MM lavé à l'acide acétique à 10 p.100 pendant 48 heures, afin de vérifier sa pureté en électrochromatographie.

1- Chromatographie

La chromatographie descendante est effectuée pendant 18 heures dans le solvant Butanol/Pyridine/Acide acétique/Eau (15/10/3/12).

Le rouge de phénol qui migre avec le front du solvant est utilisé comme marqueur externe.

TABLEAU XII

Numéro de la cellule	Tampon pyridine*- acide formique 0,1M, pH 2,9	Tampons pyridine - acide formique pH 5,0		Tampon pyridine acide acétique 2M, pH 5,0
		0,5M	1M	
1	200 ml			
2	150 ml	50 ml		
3	100 ml	100 ml		
4	50 ml	150 ml		
5		200 ml		
6		200 ml		
7		100 ml	100 ml	
8			200 ml	
9				200 ml

* La pyridine (Merck) est purifiée par distillation sur ninhydrine (1g/litre) et baryte anhydre (10g/litre). Elle est conservée à -20° C.



2- Electrophorèse

L'électrophorèse est réalisée pendant 90 minutes dans le tampon Pyridine/Acide acétique/Eau (1/10/289) de pH 3,6 sous une tension de 2200 volts.

L'appareil utilisé est un Electrophorator GILSON (modèle D-5000 volts). Un mélange d'acides aminés (acide aspartique, tyrosine, arginine) sert de témoin externe de migration électrophorétique.

3- Révélation des électrochromatogrammes

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme par coloration avec le réactif à la ninhydrine-cadmium (LIU et *al.*, 1965). Pour les peptides renfermant de l'arginine, nous avons utilisé la réaction à la phénanthrène quinone décrite par YAMADA et *al.* (1966) et EASLEY et *al.* (1969). Les peptides contenant de l'arginine présentent une fluorescence bleue intense sous lumière ultraviolette à 366 nm. Cette révélation a l'avantage d'être très sensible et très stable.

4- Purification des fractions hétérogènes

Chaque fraction hétérogène en électrochromatographie est purifiée par chromatographie ou électrophorèse préparative sur papier, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment ou encore par les 2 méthodes associées.

F) Coupage des liaisons aspartyles par l'acide acétique 0,25N

L'histone H4 contient 5 résidus d'acide aspartique dont 2 se trouvent sous forme amide. La coupure de l'histone H4 en milieu acide dilué devrait donc théoriquement nous fournir 4 fragments.

De nombreux types d'hydrolyse acide des protéines ont été décrits. PARTRIDGE et DAVIS (1950) utilisent l'acide oxalique 0,25N, SCHULTZ et *al.* (1962) utilisent l'HCl 0,03N

et SCHROEDER et *al.* (1963) l'acide acétique 0,25N. TSUNG et FRAENKEL-CONRAT (1965) associent à la fois l'HCl 0,03N et l'acide acétique à 40 p.100.

Cependant, peu de méthodes limitent l'hydrolyse aux liaisons de type Aspartyl-X. Souvent, il est observé une coupure aux liaisons Asparaginyll, Glutamyl et Glutaminyll.

Nous avons choisi l'hydrolyse par l'acide acétique 0,25N qui nous avait donné les résultats les plus satisfaisants au cours d'essais préliminaires.

150 mg d'histone H4 de gonade d'Oursin (12 μ moles) ont été hydrolysés par 15 ml d'acide acétique 0,25N (1 ml pour 10 mg de protéine), pendant 6 heures, à 105° C, en tube scellé, sous vide. L'hydrolysate a été évaporé à sec à l'aide d'un Rotary Evapomix (Büchler) et repris dans 6 ml d'HCl 0,01N, centrifugé et déposé, en 2 fois, sur une colonne de Sephadex G 50 F (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par HCl 0,01N. Le débit est de 18 ml/h et les fractions recueillies de 4,6 ml. Les peptides sont détectés dans l'éluat par lecture des densités optiques de chaque fraction à 220 et 278 nm. Les fractions correspondant à chaque pic sont rassemblées et évaporées à sec.

G) Techniques d'étude de la séquence des peptides

1- Composition en acides aminés

Les peptides sont hydrolysés par l'HCl 6N, sous vide, à 110° C, pendant 24 heures. Le dosage des acides aminés est effectué à l'aide d'un analyseur d'acides aminés BECKMAN, type Multichrom, équipé d'un intégrateur INFOTRONICS (modèle CRS 210).

2- Détermination de l'acide aminé NH₂-terminal

Elle est effectuée par la méthode de dansylation selon la technique décrite par GRAY et HARTLEY (1963). Le dansylaminoacide obtenu, après hydrolyse du dansylpeptide par

l'HCl 6N, pendant 18 heures à 105° C, est identifié par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Silicagel F 60, Merck). La chromatographie est soit monodimensionnelle dans le solvant I de STEHELIN et DURANTON (1969), soit bidimensionnelle avec les solvants I et II décrits par GROS et LABOUESSE (1969).

3-Détermination de la séquence NH₂-terminale

Elle est effectuée par dégradation récurrente du peptide selon la méthode de EDMAN (1956). Les différentes étapes de cette technique sont rassemblées dans le tableau XIII.

Après chaque cycle de dégradation, l'acide aminé libéré est soit identifié directement sous forme de son dérivé PTH (phénylthiohydantoïne-aminoacide), soit indirectement en déterminant la composition en acides aminés du peptide résiduel. C'est la méthode soustractive décrite par HIRS (1960). La dansylation associée à la dégradation de EDMAN permet l'identification de l'acide aminé NH₂-terminal du peptide résiduel.

4- Détermination de la séquence COOH-terminale

Elle est effectuée par hydrolyse cinétique du peptide avec les carboxypeptidases A, B ou C. Les acides aminés sont identifiés à l'analyseur d'acides aminés.

TABLEAU XIII
ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN

Réaction de couplage du peptide avec le PITC (Phénylisothio-
 cyanate)

↓ 40 minutes, 50°C

Elimination de l'excès de PITC

Cyclisation et coupure par l'acide trifluoroacétique

↓ 7 minutes, 50°C

Formation du dérivé 2-anilinothiazolinone

↓ HCl N, 80°C, 10 minutes

Phénylthiohydantoïne de l'acide aminé

↓ Extraction par l'acétate d'éthyle

← Phase organique

→ Phase aqueuse

Séparation des phénylthio-
 hydantoïne-amino-acides par
 chromatographie sur couche
 mince de gel de silice à l'aide
 des solvants D, E et H.
 (SJÖQUIST, 1956)

- Solvant E:

Acétate de butyle/eau/
 formamide/acide propionique
 (97:3:4:3) (v/v)

- Solvant D:

(séparation Valine et Proline)

La plaque est trempée dans un
 mélange acétone-formamide
 (3:7) (v/v)

Le solvant de migration est
 le xylène.

- Solvant H:

(séparation PTH-Asp et PTH-Asn)

Dichloroéthane 120 ml
 Acide acétique 28 ml
 Coloration spécifique par
 le réactif ninhydrine-collidine
 (ROSEAU et PANTEL, 1969)

Phénylthiohydantoïne-arginine
 Phénylthiohydantoïne-histidine

Electrophorèse sur papier
 Whatman 3 MM, à pH 3,6,
 2200 volts, 60 minutes.

- Réaction à la phénanthrène
 quinone

(identification PTH-arginine)

(YAMADA et *al.*, 1966)
 (EASLEY et *al.*, 1969)

- Réaction de Pauly

(identification PTH-histidine)



III- RESULTATS

A) Séparation et étude des peptides tryptiques solubles de l'histone H4 maléylée

Le diagramme d'élution des peptides solubles de l'hydrolysat tryptique de l'histone H4 de gonade d'Oursin oxydée et maléylée est présenté dans la figure 17.

Les peptides sont séparés en 13 fractions représentées par des traits pleins et numérotées d'après leur ordre d'élution de la colonne. Ils sont désignés par les lettres Tm et numérotés d'après leur position dans la séquence de la protéine.

L'histone H4 d'Oursin contient 14 résidus d'arginine. L'hydrolyse tryptique de la protéine maléylée devrait théoriquement fournir 15 peptides. En réalité, nous avons isolé 10 peptides qui correspondent à 78 des 102 résidus présents dans la molécule.

La composition en acides aminés de ces peptides est présentée dans le tableau XIV. Le rendement de chaque peptide a été calculé d'après le poids sec de protéine initialement hydrolysée.

Chaque peptide a été comparé avec le peptide homologue provenant de l'histone H4 de thymus de Veau : position dans le diagramme d'élution, localisation sur la carte peptidique, composition en acides aminés, acides aminés NH₂- et COOH-terminaux. Nous avons déduit de cette étude comparative la structure de chaque peptide.

Nous pouvons dire en effet que 2 peptides ont une structure identique lorsque ces peptides ont le même temps de rétention sur la colonne d'échanges d'ions, le même comportement en chromatographie ou en électrophorèse sur papier, la même composition en acides aminés, le même acide aminé en posi-

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES SOLUBLES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H4 MALEYLEE

DE GONADE D'OURSIN

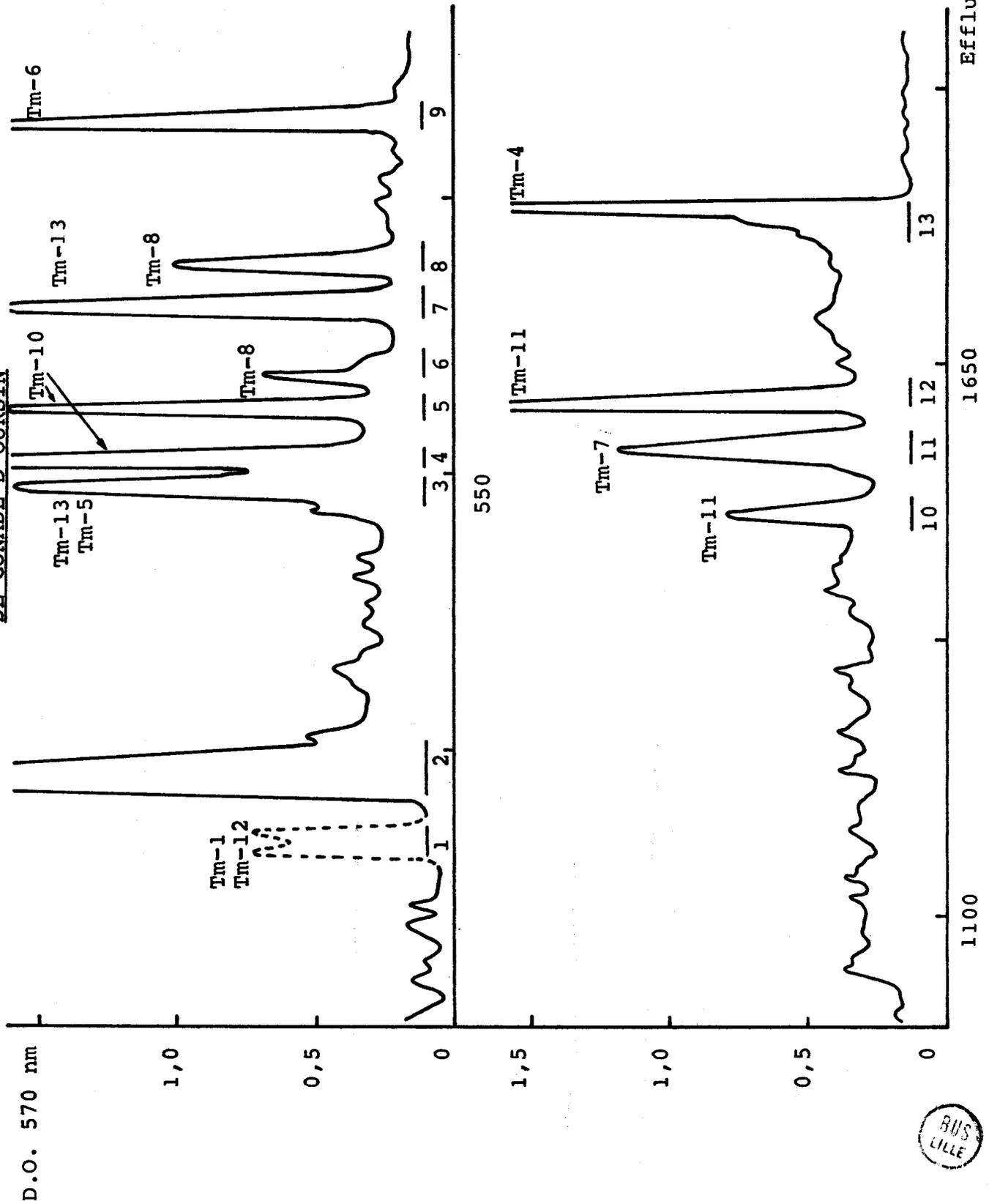


FIGURE 17



TABLEAU XIV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE MALEYLE DE L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN
(en rapports molaires par rapport à l'arginine)*

Acides aminés	Tm-1	Tm-4	Tm-5	Tm-6
Acide cystéique				
Acide aspartique			2,01 (2)	
Thréonine			1,00 (1)	
Sérine	0,90 (1)			
Acide glutamique			1,05 (1)	
Proline			1,53 (1)	
Glycine	1,03 (1)		1,06 (1)	
Alanine			1,05 (1)	1,11 (1)
Valine		0,99 (1)		
Méthionine				
Isoleucine			2,92 (3)	
Leucine		1,01 (1)		1,03 (1)
Tyrosine				
Phénylalanine				
Histidine				
Lysine			0,99 (1)	
Arginine	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
ϵ -N-Méthyllysine		0,79 (1)		
Nombre de résidus	3	4	12	3
Rendement (%)	37,5	15,5	20,2	26,6
NH ₂ -terminal	Ac-Ser	Lys (Me)	Asp	Leu
COOH-terminal	Arg	Arg	Arg	Arg
N° de la fraction où le peptide a été isolé	1	13	3	9

* Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés



TABLEAU XIV (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE MALEYLE DE L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN

(en rapports molaires par rapport à l'arginine)*

Acides aminés	Tm-7	Tm-8	Tm-10	Tm-11
Acide cystéique			1,00 (1)	
Acide aspartique			0,99 (1)	0,93 (1)
Thréonine		0,88 (1)	0,93 (1)	1,62 (2)
Sérine		0,78 (1)		
Acide glutamique		1,88 (2)	1,04 (1)	
Proline				
Glycine	1,72 (2)	0,97 (1)		
Alanine			2,02 (2)	1,84 (2)
Valine	0,87 (1)		1,01 (1)	2,17 (3)
Méthionine				0,81 (1)
Isoleucine		1,78 (2)		
Leucine		0,97 (1)		0,93 (1)
Tyrosine		0,86 (1)	0,95 (1)	0,82 (1)
Phénylalanine				
Histidine			1,22 (1)	
Lysine	1,15 (1)		0,93 (1)	1,90 (2)
Arginine	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
ϵ -N-Méthyllysine				
Nombre de résidus	5	10	11	14
Rendement (%)	14,1	31,9	23,3	16,4
NH ₂ -terminal	Gly	Ile	Asp	Lys
COOH-terminal	Arg	Arg	Arg	Arg
N° de la fraction où le peptide a été isolé	11	6 et 8	4 et 5	10 et 12

* Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés



TABLEAU XIV (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE MALEYLE DE L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN

(en rapports molaires par rapport à l'arginine)*

Acides aminés	Tm-12	Tm-13	Nb total de résidus	Histone H4
Acide cystéique			1	1
Acide aspartique			4	5
Thréonine		0,99 (1)	6	6
Sérine			2	2
Acide glutamique	1,04 (1)		6	6
Proline			1	1
Glycine	1,03 (1)	3,08 (3)	11	17
Alanine			6	7
Valine			6	9
Méthionine			1	1
Isoleucine			5	6
Leucine		1,09 (1)	5	8
Tyrosine		1,01 (1)	4	4
Phénylalanine		1,00 (1)	1	2
Histidine			1	2
Lysine			5	10
Arginine	1,00 (1)		11	14
ϵ -NH ₂ -Méthyllysine			1	1
Nombre de résidus	3	7	78	102
Rendement (%)	40	33		
NH₂-terminal	Glp	Thr		Ac-Ser
COOH-terminal	Arg	Gly		Gly
N° de la fraction où le peptide a été isolé	1	3 et 7		

* Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés



tion NH₂-terminale et le même acide aminé à l'extrémité COOH-terminale.

La séquence en acides aminés des 10 peptides tryptiques solubles de l'histone H4 de gonade d'Oursin oxydée et maléylée est présentée dans le tableau XV.

Parmi ces peptides, 8 ont leur équivalent dans l'hydrolysate tryptique de l'histone H4 de thymus de Veau (SAUTIERE, 1973). Les 2 autres peptides (Tm-10 et Tm-11) sont un peu différents des peptides homologues du thymus de Veau : le peptide Tm-10 contient l'unique résidu de cystéine de la protéine et le peptide Tm-11, qui contient le résidu de méthionine, possède un résidu de lysine en position NH₂-terminale, ce qui explique qu'il n'ait pas été retrouvé dans l'hydrolysate tryptique de l'histone H4 native. Par contre, il a été signalé par DELANGE et *al.* (1969a) dans l'hydrolysate tryptique de l'histone H4 maléylée.

D'autre part, au cours de l'oxydation performique de la protéine, obtenue sous forme de chlorhydrate par la méthode de préparation utilisée (JOHNS, 1967), l'acide performique a provoqué la libération de chlore qui est venu se fixer sur les résidus de tyrosine.

Ce phénomène explique que les peptides contenant de la tyrosine ont été isolés à partir de 2 fractions différentes du diagramme d'élution, le peptide contenant la tyrosine chlorée (80 p. 100) étant élué plus tard que celui contenant la tyrosine non modifiée (20 p. 100). En effet, lors de l'analyse d'acides aminés, la tyrosine chlorée est éluée plus tardivement, au niveau de l'histidine.

C'est le cas des peptides Tm-8, Tm-10, Tm-11 et Tm-13.

Certains peptides tryptiques solubles présentent un intérêt particulier :

TABLEAU XV

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE DE L'HYDROLYSAT
TRYPSIQUE MALEYLE DE L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN

Tm-1 (résidus 1 à 3)	N-acétyl-Ser-Gly-Arg
Tm-4 (résidus 20 à 23)	$\overrightarrow{\text{Lys}}(\text{Me})-\overrightarrow{\text{Val}}-\text{Leu}-\text{Arg}$
Tm-5 (résidus 24 à 35)	$\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\text{Ile}-\text{Thr}-\text{Lys}-\text{Pro}-\text{Ala}-\text{Ile}-\text{Arg}$
Tm-6 (résidus 37 à 39)	$\overline{\text{Leu}}-\text{Ala}-\text{Arg}$
Tm-7 (résidus 41 à 45)	$\overline{\text{Gly}}-\text{Gly}-\text{Val}-\text{Lys}-\text{Arg}$
Tm-8 (résidus 46 à 55)	$\overline{\text{Ile}}-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Ile}-\text{Tyr}-\text{Glu}-\text{Glu}-\text{Thr}-\text{Arg}$
Tm-10 (résidus 68 à 78)	$\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Tyr}}-\overrightarrow{\text{Cys}}-\overleftarrow{\text{Glu}}-\overleftarrow{\text{His}}-\overleftarrow{\text{Ala}}-\overleftarrow{\text{Lys}}-\overleftarrow{\text{Arg}}$
Tm-11 (résidus 79 à 92)	$\overline{\text{Lys}}-\text{Thr}-\text{Val}-\text{Thr}-\text{Ala}-\text{Met}-\text{Asp}-\text{Val}-\text{Val}-\text{Tyr}-\text{Ala}-\text{Leu}-\text{Lys}-\text{Arg}$
Tm-12 (résidus 93 à 95)*	$\overline{\text{Glp}}-\text{Gly}-\text{Arg}$
Tm-13 (résidus 96 à 102)	$\overline{\text{Thr}}-\text{Leu}-\text{Tyr}-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{Gly}-\text{Gly}(\text{OH})$

* Glp : acide pyroglutamique. Ce peptide dérive du peptide Gln-Gly-Arg par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

Les méthodes utilisées pour la détermination de la séquence des peptides sont indiquées de la façon suivante: Dansylation — placé au-dessus du résidu d'acide aminé

Dégradation de Edman →

Hydrolyse par les carboxypeptidases ←



Peptide Tm-1 (résidus 1 à 3)

N-Acétyl-Ser-Gly-Arg

Le peptide Tm-1 est obtenu dans la fraction 1 avec le peptide Glp-Gly-Arg, dérivé du peptide Tm-12 par cyclisation du résidu de glutamine en acide pyroglutamique.

Bien que sur le diagramme d'élution (p. 91), on puisse noter une séparation partielle mais non satisfaisante des 2 peptides, nous avons traité l'ensemble de la fraction 1 parce que les études antérieures menées dans notre laboratoire sur les peptides trypsiques de l'histone H4 de thymus de Veau avaient montré sans équivoque la présence des peptides Ac-Ser-Gly-Arg et Glp-Gly-Arg dans la fraction 1 du diagramme d'élution des peptides trypsiques (SAUTIERE et *al.*, 1971).

D'ailleurs, la présence du peptide Ac-Ser-Gly-Arg a été confirmée par l'étude des peptides obtenus par hydrolyse trypsique du fragment 1 à 24 de l'histone H4, fragment isolé après hydrolyse partielle de la protéine par l'acide acétique 0,25N.

Le peptide Tm-1 n'est pas révélé par la réaction à la ninhydrine, ce qui manifeste un blocage du groupe α -aminé terminal. Il est mis en évidence par les réactions spécifiques de l'arginine : la réaction de Sakaguchi ou la réaction à la phénanthrène quinone. L'absence d'un groupe NH₂-terminal libre a été démontrée par dansylation.

La perte d'une charge positive par acétylation du groupe α -aminé terminal induit chez ce peptide un comportement acide qui se traduit par une élution précoce de la colonne d'échangeurs d'ions et une migration anodique en électrophorèse à pH 3,6.

Il a été obtenu avec un rendement de 37,5 p.100 tandis que le peptide Tm-12 : Glp-Gly-Arg a été isolé avec un rendement de 40 p.100.

Peptide Tm-4 (résidus 20 à 23)

Lys(Me)-Val-Leu-Arg

Le peptide Tm-4 a été isolé de la fraction 13 par chromatographie préparative sur papier. Il est obtenu avec un rendement de 15,5 p.100.

La présence d' ϵ -NH₂-méthyllysine a été établie par analyse des acides aminés sur une colonne de résine M 71 Beckman (hauteur 16 cm, réticulation de la résine 7 p.100) avec un tampon d'élution de pH 5,28, à 55° C.

Dans ces conditions, les acides aminés basiques sont séparés dans l'ordre suivant : lysine, ϵ -NH₂-méthyllysine, histidine et arginine.

Deux étapes de dégradation de EDMAN, utilisée en méthode soustractive, ont permis de placer le résidu de méthyllysine en position NH₂-terminale du peptide Tm-4 et le résidu de valine en deuxième position.

	Val	Leu	Arg	Lys(Me)
<u>Composition</u> :	0,99	1,01	1,00	0,79
<u>1er cycle</u> :	0,95	0,93	1,00	<u>0,17</u>
<u>2ème cycle</u> :	<u>0,33</u>	0,79	1,00	0,21

Ce peptide correspond manifestement au peptide Tm-7 de l'histone H4 de thymus de Veau.

Peptide Tm-10 (résidus 68 à 78)

Asp-Ala-Val-Thr-Tyr-Cys-Glu-His-Ala-Lys-Arg

Le peptide Tm-10 est isolé de la fraction 4, où il est contaminé par de l'arginine libre, par chromatographie préparative sur papier. Il est obtenu avec un rendement de 4,6 p.100.

Il est également isolé de la fraction 5 par chromatographie préparative sur papier. Il est alors obtenu avec un rendement de 18,7 p.100.

L'élution précoce de ce peptide s'explique par la présence d'un résidu d'acide cystéique, résultat de l'oxy-

dition de la cystéine par l'acide performique. Il est plus ou moins révélé par le réactif de Sakaguchi; ceci est dû à la présence d'histidine dans le peptide.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Asp

Dégradation de EDMAN : 5 cycles de dégradation de EDMAN avec identification directe des PTH-aminoacides libérés nous a permis d'établir la séquence NH₂-terminale du peptide :

Asp-Ala-Val-Thr-Tyr

Hydrolyse par les carboxypeptidases B et A :

L'étude cinétique de l'hydrolyse du peptide Tm-10 par les carboxypeptidases B et A a permis d'établir la séquence COOH-terminale suivante :

His-Ala-Lys-Arg

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVI. Nous avons abaissé le pH de 8,7 à 6,0 au bout de 30 minutes d'action de la Cp A afin de faciliter la libération de l'acide glutamique et de l'acide cystéique. Mais l'histidine n'étant pas encore libérée à ce moment, la fin de l'hydrolyse a été très lente. Après 120 minutes d'hydrolyse, on commence à voir apparaître l'acide glutamique.

D'après ces résultats, nous avons pu établir la séquence du peptide Tm-10, le résidu d'acide cystéique étant placé par différence. Cette séquence a d'ailleurs été confirmée par l'étude du peptide acétique Ac-3 (résidus 69 à 85). Sur ce peptide, 8 cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale suivante :

Ala-Val-Thr-Tyr-Cys-Glu-His-Ala

séquence qui correspond à la partie médiane du peptide Tm-10.

Peptide Tm-11 (résidus 79 à 92)

Lys-Thr-Val-Thr-Ala-Met-Asp-Val-Val-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg

Le peptide Tm-11 a été isolé pur de la fraction 10, avec un rendement de 4,5 p.100 et de la fraction 12 avec

TABLEAU XVI

ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PEPTIDE Tm-10
PAR LES CARBOXYPEPTIDASES B + A

Chaque prélèvement correspond à 30 nanomoles environ.
Les résultats sont exprimés en nombre de nanomoles
d'acides aminés libérés.

Acides aminés	CpB 10'	CpB 10' CpA 5'	CpB 10' CpA 10'	CpB 10' CpA 20'	CpB 10' CpA 30'	CpB 10' CpA 60'*
Acide glutamique						
Alanine		17,760	22,101	23,936	24,676	24,015
Histidine						3,573
Lysine	22,842	23,403	23,775	23,401	23,993	23,041
Arginine	29,817	30,797	29,823	29,748	29,822	28,676

* Après le prélèvement de CpB 10' + CpA 30', le pH initialement à 8,7 (tampon N-éthylmorpholine) a été abaissé à 6 par addition d'acide acétique. En effet, la CpA libère plus facilement l'acide glutamique et la cystéine à pH 6.

Acides aminés	CpB 10' CpA 90'	CpB 10' CpA 120'	CpB 10' CpA 180'	CpB 10' CpA 240'	CpB 10' CpA 24h
Acide glutamique		4,008	3,840	4,160	5,350
Alanine	24,354	24,791	24,740	30,140	29,460
Histidine	6,127	7,640	10,660	14,120	17,700
Lysine	23,502	24,700	23,350	25,970	24,410
Arginine	32,099	28,814	28,030	28,540	25,930

un rendement de 16,4 p.100.

Ce peptide est caractérisé par la présence de l'unique résidu de méthionine de la molécule. La méthionine a été identifiée sous forme de méthionine sulfone (produit d'oxydation de la méthionine par l'acide performique) qui est élue très tôt, entre l'acide aspartique et la thréonine.

La valeur assez basse (2,17 pour 3 résidus) obtenue pour la valine s'explique par la présence d'une liaison Val-Val incomplètement hydrolysée après 24 heures d'hydrolyse.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Lys

Peptide Tm-12 (résidus 93 à 95)

Glp-Gly-Arg

Le peptide Tm-12 est obtenu dans la fraction 1 avec le peptide Tm-1 : Ac-Ser-Gly-Arg (voir p. 97).

Il est obtenu avec un rendement de 40 p.100. Il dérive du peptide Gln-Gly-Arg par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique, ce qui confère un caractère acide à ce peptide.

Il n'est pas révélé par la ninhydrine, mais cependant, il est décelé dans l'hydrolysate par la réaction de Sakaguchi, et sur la carte peptidique par la réaction à la phénanthrène quinone.

Par dansylation du peptide, nous avons pu démontrer que le groupe NH₂-terminal était bloqué.

Peptide Tm-13 (résidus 96 à 102)

Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly(OH)

Le peptide Tm-13 a été isolé pur de la fraction 7 avec un rendement de 33 p.100. Cette fraction 7 est la seule du diagramme d'élution à n'être pas révélée par la réaction de Sakaguchi. L'absence d'arginine et l'étroite spécificité de la trypsine pour les liaisons Arginyl-X dans une protéine maléylée suggèrent que le peptide Tm-13 se trouve en position COOH-terminale dans l'histone H4.

Il contient l'un des 2 résidus de phénylalanine et l'un des 4 résidus de tyrosine de l'histone H4.

Dans la fraction 7, le peptide Tm-13 a son résidu de tyrosine sous forme de chlorotyrosine. Une faible quantité de ce peptide avec son résidu de tyrosine "intact" est retrouvée dans la fraction 3.

Dansylaminoacide_NH2-terminal : DNS-Thr

Ce peptide est analogue au peptide T-18 de l'histone H4 de thymus de Veau.

Arginine libre

La molécule d'histone H4 contient 2 liaisons Arginyl-arginyl (résidus 35 et 36; 39 et 40). Leur hydrolyse par la trypsine entraîne la libération d'arginine libre qui est éluée dans la fraction 4, avec le peptide Tm-10 dont elle est séparée par électrophorèse préparative. L'arginine libre a été obtenue avec un rendement de 33 p.100.

Le bilan des peptides tryptiques solubles de l'histone H4 de gonade d'Oursin, oxydée et maléylée, fait apparaître un déficit de 24 résidus d'acides aminés.

Ce déficit peut s'expliquer par l'obtention d'une importante fraction insoluble qui apparaît lors de la démaléylation des peptides de l'hydrolysate. Cette fraction insoluble a été lyophilisée. Nous avons obtenu 36,2 mg de matériel que nous avons soumis à l'action de la TPCK-trypsine, pendant 2 heures, à 37° C et pH 8,0.

B) Séparation et étude des peptides tryptiques de la fraction insoluble de l'hydrolysate tryptique de l'histone H4 maléylée

Le diagramme d'élution des peptides tryptiques de la fraction insoluble est présenté dans la figure 18 et montre la séparation des peptides en 12 fractions. La fraction n° 1 renferme uniquement l'ammoniac.

Par purification des 11 autres fractions, nous avons obtenu 18 peptides dont certains ont déjà été identifiés parmi les peptides de la fraction soluble. Ils sont désignés par la lettre T suivie d'un chiffre qui désigne leur position dans la séquence de la protéine.

La composition en acides aminés de ces peptides est présentée dans le tableau XVII et leur séquence en acides aminés dans le tableau XVIII.

Nous pouvons faire quelques remarques :

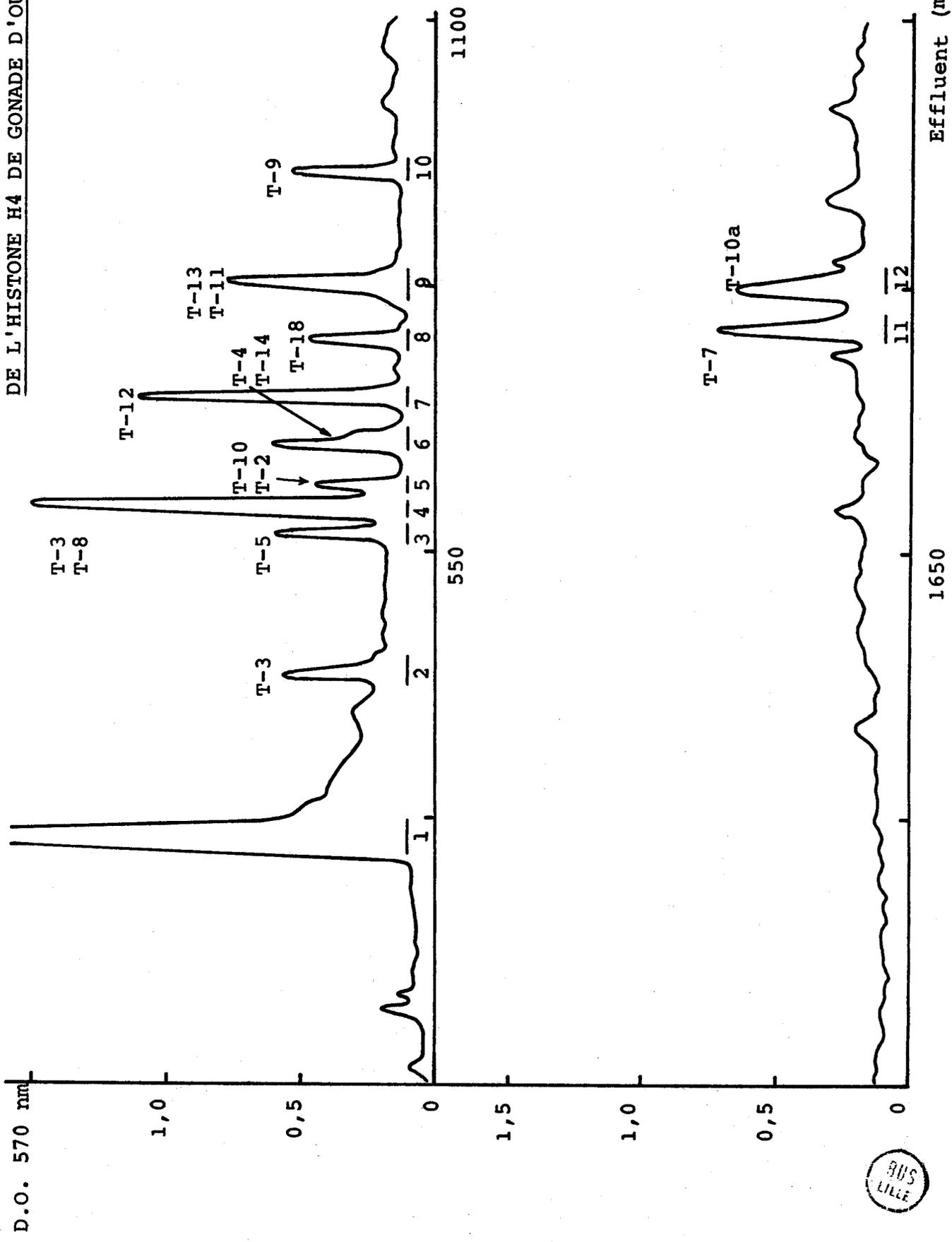
a- Nous avons retrouvé les peptides T-2, T-3, T-4 et T-5 qui recouvrent presque totalement le peptide Tm-2, absent du premier fractionnement, mais avec des rendements très faibles.

b- D'autre part, nous n'avons pas isolé le peptide Gly-Gly-Ala-Lys-Arg (résidus 13 à 17) dans lequel le résidu de lysine en position 16 serait acétylé. Nous verrons plus loin que 20 p.100 des molécules d'histone H4 de gonade d'Oursin sont acétylées au niveau du résidu de lysine 16. Ce faible taux d'acétylation peut expliquer pourquoi le peptide Gly-Gly-Ala-Lys(Ac)-Arg n'a pu être identifié dans l'hydrolysate tryptique.

c- Nous avons isolé à la fois les peptides Gly-Gly-Val-Lys (résidus 41 à 44) et Gly-Gly-Val-Lys-Arg (résidus 41 à 45).

d- Dans la fraction 9, nous avons retrouvé un mélange des peptides T-11 et T-13. Par 4 cycles de dégradation de EDMAN avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous avons pu démontrer les 2 séquences NH₂-terminales

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES DE LA FRACTION INSOLUBLE DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE MALEYLE
 DE L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN



1650
 FIGURE 18

TABLEAU XVII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA FRACTION INSOLUBLE DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE MALEYLE.

Amino-Acides	T ₂ [*]	T ₃ [*]	T ₄ [*]	T ₅ [*]	T ₇
Acide cystéique					
Acide aspartique					
Thréonine					
Sérine					
Acide glutamique					
Proline					
Glycine	1.42 (1)	2.05 (2)	2.25 (2)	2.16 (2)	
Alanine				1.09 (1)	
Valine					0.85 (1)
Méthionine					
Isoleucine					
Leucine			1.12 (1)		0.91 (1)
Tyrosine					
Phénylalanine					
Histidine					
Lysine	1.00 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	
Arginine					1.00 (1)
ε-N-Méthyllysine					0.77 (1)
Nombre de résidus	2	3	4	4	4
Rendement (%)	2	4.7	5	4.75	6
NH ₂ terminal	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys (Me)
COOH terminal	Lys	Lys	Lys	Lys	Arg
N° de la fraction où le peptide a été isolé	5	2 et 4	6	3	11

* Peptide qui n'a pas été retrouvé dans la fraction soluble de l'hydrolysat trypsinique maléyle.



TABLEAU XVII (suite)

Amino-Acides	T ₈	T ₉	T ₁₀ [*]	T ₁₀ ^a	T ₁₁
Acide cystéique					
Acide aspartique	1.73(2)				
Thréonine	0.84(1)				0.89(1)
Sérine					0.87(1)
Acide glutamique	0.97(1)				1.75(2)
Proline	0.92(1)				
Glycine	1.19(1)		2.30(2)	2.22(2)	1.29(1)
Alanine	0.95(1)	1.01(1)			
Valine			0.82(1)	0.96(1)	
Méthionine					
Isoleucine	2.90(3)				1.50(2)
Leucine		0.92(1)			1.00(1)
Tyrosine					(1)
Phénylalanine					
Histidine					
Lysine	0.95(1)		1.00(1)	1.18(1)	
Arginine	1.00(1)	1.00(1)		1.00(1)	1.00(1)
ε-N-Méthyllysine					
Nombre de résidus	12	3	4	5	10
Rendement (%)	3.8	9.4	2.1	3.5	10
NH ₂ terminal	Asp	Leu	Gly	Gly	Ile
COOH terminal	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg
N° de la fraction où le peptide a été isolé	4	10	5	12	9

* Peptide qui n'a pas été retrouvé dans la fraction soluble de l'hydrolysate trypsique maléylé.



TABLEAU XVII (suite)

Amino-Acides	T ₁₂ [*]	T ₁₃ [*]	T ₁₄	T ₁₈	Total	Histone H4
Acide cystéique			1.00 (1)		1	1
Acide aspartique		1.08 (1)	1.16 (1)		4	5
Thréonine			1.31 (1)	0.66 (1)	4	6
Sérine					1	2
Acide glutamique		0.89 (1)	1.35 (1)		5	6
Proline					1	1
Glycine	1.24 (1)			3.08 (3)	15	17
Alanine			2.27 (2)		5	7
Valine	1.03 (1)	1.80 (2)	1.53 (1)		6	9
Méthionine						1
Isoleucine		0.68 (1)			6	6
Leucine	1.11 (1)	0.95 (1)		1.00 (1)	7	8
Tyrosine			1.00 (1)	0.83 (1)	3	4
Phénylalanine		1.04 (1)		0.94 (1)	2	2
Histidine			1.37 (1)		1	2
Lysine	1.00 (1)		1.08 (1)		8	10
Arginine		1.00 (1)	1.00 (1)		7	14
ε-N-Méthyllysine					1	1
Nombre de résidus	4	8	11	7	77	102
Rendement (%)	23,2	20	2,2	6		
NH ₂ terminal	Gly	Val	Asp	Thr		Ac-Ser
COOH terminal	Lys	Arg	Arg	Gly		Gly
N° de la fraction où le peptide a été isolé	7	9	6	8		

* Peptide qui n'a pas été retrouvé dans la fraction soluble de l'hydrolysate trypsique maléylé.



TABLEAU XVIII

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE TRYPSIQUE
DE LA FRACTION INSOLUBLE DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE MALEYLE

T-2*	(résidus 4 et 5)	<u>Gly</u> -Lys
T-3*	(résidus 6 à 8)	<u>Gly</u> -Gly-Lys
T-4*	(résidus 9 à 12)	<u>Gly</u> -Leu-Gly-Lys
T-5*	(résidus 13 à 16)	<u>Gly</u> -Gly-Ala-Lys
T-7	(résidus 20 à 23)	<u>Lys</u> (Me)-Val-Leu-Arg
T-8	(résidus 24 à 35)	<u>Asp</u> - <u>Asn</u> - <u>Ile</u> - <u>Gln</u> -Gly-Ile-Thr-Lys-Pro-Ala-Ile-Arg
T-9	(résidus 37 à 39)	<u>Leu</u> -Ala-Arg
T-10*	(résidus 41 à 44)	<u>Gly</u> -Gly-Val-Lys
T-10a	(résidus 41 à 45)	<u>Gly</u> -Gly-Val-Lys-Arg
T-11	(résidus 46 à 55)	<u>Ile</u> - <u>Ser</u> - <u>Gly</u> - <u>Leu</u> -Ile-Tyr-Glu-Glu-Thr-Arg
T-12*	(résidus 56 à 59)	<u>Gly</u> -Val-Leu-Lys
T-13*	(résidus 60 à 67)	<u>Val</u> - <u>Phe</u> - <u>Leu</u> - <u>Glu</u> -Asn-Val-Ile-Arg
T-14	(résidus 68 à 78)	<u>Asp</u> -Ala-Val-Thr-Tyr-Cys(SO ₃ H)-Glu-His-Ala-Lys-Arg
T-18	(résidus 96 à 102)	<u>Thr</u> -Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly(OH)

* Peptide qui n'a pas été retrouvé dans la fraction soluble de l'hydrolysat trypsinique maléylé.
La signification des signes placés au-dessus des résidus d'acides aminés est indiquée dans le tableau XV.

suivantes :

Ile-Ser-Gly-Leu et Val-Phe-Leu-Glu

e- Nous avons isolé de l'arginine libre dans la fraction 4 où elle contamine le peptide T-3. Elle est obtenue avec un rendement de 27 p.100.

Le bilan des 2 fractionnements réalisés sur l'hydrolysats tryptique de l'histone H4 de gonade d'Oursin montre que 100 des 102 résidus présents dans la protéine ont été replacés dans la séquence. Un seul peptide, His-Arg (résidus 18 et 19), n'a pu être élué de la colonne d'échangeurs d'ions malgré la poursuite de l'éluion pendant 24 heures avec le tampon pyridine 2M - acide acétique de pH 5,0.

La présence d'arginine libre dans l'hydrolysats traduit l'existence de liaisons Arginyle-arginyle dont nous voudrions confirmer la position.

Nous avons donc hydrolysé la protéine au niveau des résidus d'acide aspartique par l'acide acétique 0,25N. L'obtention de fragments plus étendus de la protéine (coupure au niveau des résidus Asp 24, Asp 68 et Asp 85) nous a permis d'obtenir des recouvrements avec les peptides tryptiques et de confirmer la séquence de la protéine.

C) Séparation des fragments obtenus par hydrolyse partielle acide de l'histone H4 de gonade d'Oursin

Les peptides obtenus par hydrolyse de l'histone H4 avec l'acide acétique 0,25N, pendant 6 heures, à 110° C, en tube scellé et sous vide, ont été fractionnés sur une colonne de Sephadex G 50 F. Le diagramme d'élu-tion des peptides de même que leur composition en acides aminés ont été présentés dans une publication à FEBS Letters (1976). Nous nous permettons d'inclure ici la reproduction de cette publication.

Nous pouvons voir sur la figure 2 de la publication que le diagramme d'élu-tion comprend 7 fractions, à partir desquelles nous avons isolé 5 peptides appelés Ac (Acétique) et numérotés d'après leur position dans la séquence de la protéine.

Les 2 premières fractions, hétérogènes en électrochromatographie, correspondent à un mélange de gros fragments que nous n'avons pas cherché à séparer.

Les 2 fractions suivantes se comportent de façon identique en électrochromatographie : elles forment une longue traînée depuis le point de dépôt. A l'analyse d'acides aminés, elles se révèlent hétérogènes; elles ont donc été purifiées.

- la première par chromatographie d'échanges d'ions sur CM-Cellulose (Whatman CM-52). La colonne (25 x 2,5 cm) est équilibrée en tampon acétate de Na 0,125M de pH 4,3 et éluée par un gradient de chlorure de Na de 0 à 1M dans le même tampon. L'élu-tion est ensuite poursuivie par l'HCl 0,02M.

Cette fraction nous a donné le peptide Ac-1a (résidus 1 à 67).

- la seconde par rechromatographie sur une colonne de Sephadex G 50 F (colonne 200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par HCl 0,01N. Cette fraction nous a donné le peptide Ac-2 (résidus 25-67 ou 26-68).

COVALENT STRUCTURE OF THE SEA URCHIN HISTONE H₄

D. WOUTERS-TYROU, P. SAUTIÈRE and G. BISERTE

*Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 124 I.N.S.E.R.M.)
B.P. n° 3567, 59020 Lille Cédex, France*

Received 5 April 1976

1. Introduction

The primary structure of the histone H₄ has been determined in many species and shown to be highly conservative throughout evolution [1–5].

However, in the Echinoderms, the histone H₄ is characterized by the presence of one residue of cysteine [6–10]. In the histone H₄ from the sea urchin *Parechinus angulosus* [10], the residue of cysteine was identified at position 73 in place of a residue of threonine as found in calf histone H₄.

In this paper, the complete amino acid sequence of histone H₄ from the sea urchin *Psammechinus miliaris* is presented.

The primary structure was deduced from the data provided by the tryptic peptides from the oxidized and maleylated protein and by the acetic acid fragments of the protein. The sea urchin histone H₄ was found to be acetylated at a lesser extent than calf histone H₄ at the residue of lysine 16.

2. Materials and methods

Gonads of the sea urchin *Psammechinus miliaris* were frozen in solid CO₂ after excision and kept at –20°C until use.

Chromatin was obtained either from purified nuclei as described previously [9] or directly from the gonads according to the procedure of Strickland et al. [10]. The F_{2a} histone fraction was extracted

from the chromatin and subsequently fractionated in F_{2a1} and F_{2a2} subfractions as described by Johns [11]. The histone H₄ was isolated from the F_{2a1} fraction by gel filtration chromatography on Biogel P 60 column equilibrated and eluted with 0.01 N HCl–0.05 M NaCl–0.02% NaN₃.

The purity of the protein was assessed by electrophoresis in polyacrylamide gel at pH 2.7 according to Panyim and Chalkley [12] using a 17% acrylamide concentration.

The amino acid composition was established on 24 h and 72 h hydrolysates.

After performic acid oxidation according to Hirs [13], the histone was maleylated and hydrolyzed with TPCK-treated trypsin for 4 h at pH 8.0 and 37°C in 0.1 M NH₄HCO₃, using an enzyme/substrate ratio of 1:50.

After demaleylation [1] the tryptic peptides were fractionated on Chromobeads P column (Technicon) with pyridine–formate and pyridine–acetate buffers [14].

Cleavage of aspartyl bonds by 0.25 N acetic acid was performed at 105°C for 6 h in sealed evacuated tubes (10 mg of protein per ml of acetic acid). The cleavage products were fractionated on Sephadex G 50 F column equilibrated and eluted with 0.01 N HCl.

Structural studies of the peptides were carried out as described previously [3].

For the determination of ϵ -N-acetyllysine peptides were hydrolyzed with aminopeptidase M for 24 h at 40°C and pH 8.0 in 0.1 M NH₄HCO₃ (0.5 mg of enzyme per μ mole of peptide). The hydrolysates were subsequently analyzed on a Beckman Multichrom amino acid analyzer.

Abbreviation: TPCK, L-(1-tosylamido-2-phenyl)-ethyl chloromethyl ketone.

TABLEAU XX

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE
 TRYPSIQUE DU FRAGMENT Ac-1 (résidus 1 à 24) DE
 L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN

T-1	(résidus 1 à 3)	N-Acétyl-Ser-Gly-Arg
T-2	(résidus 4 et 5)	$\overline{\text{Gly-Lys}}$
T-3	(résidus 6 à 8)	$\overline{\text{Gly-Gly-Lys}}$
T-4	(résidus 9 à 12)	$\overline{\text{Gly-Leu-Gly-Lys}}$
T-5	(résidus 13 à 16)	$\overline{\text{Gly-Gly-Ala-Lys}}$
T-5a	(résidus 13 à 17)	$\overline{\text{Gly-Gly-Ala-Lys-Arg}}$
T-6	(résidus 18 et 19)	$\overrightarrow{\text{His-Arg}}$
T-7	(résidus 20 à 23)	$\overrightarrow{\text{Lys(Me)-Val-Leu-Arg}}$
T-7a	(résidus 20 à 24)	$\overrightarrow{\text{Lys(Me)-Val-Leu-Arg-Asp}}$

La signification des signes placés au-dessus des résidus d'acides aminés est indiquée dans le tableau XV.

Parmi les peptides obtenus, nous pouvons signaler la présence du peptide T-1

Ac-Ser-Gly-Arg, isolé de la fraction 2,
du peptide T-6

His-Arg, que nous n'avions pu isoler précédemment
et du peptide T-7a

Lys(Me)-Val-Leu-Arg-Asp, obtenu par hydrolyse incomplète de la liaison Arg-Asp (23-24) par la trypsine. Cette hydrolyse incomplète est probablement due à la présence d'un résidu d'acide aspartique au voisinage du résidu d'arginine. Une résistance analogue à l'action de la trypsine a déjà été signalée par SAUTIERE et *al.* (1974) et KMIECIK (1976).

Peptide T-6 (résidus 18 et 19)

His-Arg

Il a été isolé pur de la fraction 11 avec un rendement de 8,6 p.100.

Dégradation de Edman. Un cycle de dégradation de Edman avec identification directe du PTH-histidine a permis de vérifier la séquence du peptide His-Arg, ce que laissait supposer la spécificité de la trypsine.

Tous les peptides de ce fractionnement contenant de la lysine susceptible d'être acétylée, c'est-à-dire les peptides T-2, T-3, T-4, T-5 et T-5a ont été hydrolysés par l'aminopeptidase M en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1M de pH 7,9 et à 40° C.

Le rapport enzyme/substrat est de 0,5 mg d'enzyme par μ mole de peptide. Une goutte de toluène est ajoutée dans le milieu afin d'éviter le développement de microorganismes.

Ces hydrolysats ont été analysés sur le Multi-chrom Beckman afin de mettre en évidence la présence éventuelle d'acétyllysine. L'acétyllysine est éluée entre la proline et la glycine. En fait, un seul peptide contient de l'acétyllysine, il s'agit du peptide Gly-Gly-Ala-Lys-Arg, obtenu avec un rendement approximativement 4 fois plus faible que le peptide Gly-Gly-Ala-Lys (21,4 p.100 contre 78,5 p.100).

Nous pouvons en déduire qu'environ 20 p.100 des molécules possèdent un résidu d'acétyllysine en position 16. Chez le Veau, il existe 50 p.100 des molécules acétylées à ce niveau.

D'ailleurs, la comparaison des migrations électrophorétiques des 2 histones H4 de Veau et d'Oursin permet de mettre en évidence cette différence d'acétylation (figure 16 A). Chez le Veau, nous pouvons observer 2 bandes à peu près aussi intenses l'une que l'autre représentant les formes non acétylée et monoacétylée sur le résidu de lysine en position 16. Par contre, chez l'Oursin, nous voyons 1 bande très intense représentant la forme non acétylée. Il existe une autre bande, mais très faible et diffuse et de migration plus anodique, représentant la forme monoacétylée sur le résidu de lysine en position 16.

Peptide Ac-2 (résidus 25-67 ou 26-68)

La composition du peptide Ac-2 est caractéristique de la région 25-67 de la molécule.

Dégradation de Edman

Quatre cycles de dégradation de Edman avec identification directe des PTH-aminoacides libérés ont permis de mettre en évidence une certaine hétérogénéité de cette fraction.

Nous avons pu identifier :

- au premier cycle PTH-Asn et PTH-Ile
- au deuxième cycle PTH-Ile et PTH-Gln
- au troisième cycle PTH-Gln et PTH-Gly
- au quatrième cycle PTH-Gly et PTH-Ile

Nous sommes, en fait, en présence d'un mélange des 2 peptides 25-67 et 26-68 dont les séquences NH₂-terminales sont respectivement :

	Asn-Ile-Gln-Gly
	25 28
et	Ile-Gln-Gly-Ile
	26 29

L'obtention de ces 2 peptides s'explique par une désamidation partielle du résidu d'asparagine en position 25, ce qui procure un site supplémentaire de coupure pour l'acide acétique, au niveau de la liaison Asn-Ile (25-26).

Peptide Ac-3 (résidus 69 à 85)

La composition du peptide Ac-3 correspond à la composition en acides aminés du fragment 69 à 85. Elle est caractérisée par la présence de l'unique résidu de cystéine de la molécule.

Dégradation de Edman

Huit cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale suivante :

Ala-Val-Thr-Tyr-Cys-Glu-His-Ala

Les résultats de ces dégradations sont présentés dans le tableau XXI.

Le peptide Ac-3 recouvre 2 peptides tryptiques de l'histone maléylée : le peptide Tm-10, caractérisé par la présence du résidu de cystéine et le peptide Tm-11, caractérisé par la présence du résidu de méthionine.

L'étude de l'hydrolysat partiel acide de l'histone H4 de gonade d'Oursin nous a donc permis de recouvrir entièrement la séquence en acides aminés de la molécule et de vérifier l'alignement des peptides tryptiques.

TABLEAU XXI

ETUDE DE LA SEQUENCE NH₂-TERMINALE DU PEPTIDE AC-3 PAR DEGRADATION DE EDMAN

(Les résultats sont exprimés en nombre de résidus d'acides aminés dans le peptide résiduel après chaque cycle de dégradation)

	Asp,	Thr,	Glu,	Ala,	1/2 Cys,	Val,	Met,	Tyr,	His,	Lys,	Arg
Composition initiale	0,85 (1)	2,65 (3)	0,92 (1)	2,85 (3)	0,35 (1)	2,04 (2)	0,90 (1)	0,87 (1)	0,95 (1)	2,11 (2)	1,33 (1)
1er cycle	0,83	2,69	1,42	<u>2,12</u>	0,30	2,13	0,91	1,07	0,96	2,08	1,48
2ème cycle	0,73	2,33	1,09	1,79	0,34	<u>1,19</u>	0,71	0,79	0,81	1,64	1,11
3ème cycle	0,73	<u>1,89</u>	1,13	1,80	0,35	1,08	0,74	0,78	0,83	1,58	1,10
4ème cycle	0,83	2,20	1,11	1,93	0,38	1,11	0,62	<u>0,40</u>	0,89	1,45	1,20
5ème cycle	0,86	1,93	1,24	1,78	<u>0,15</u>	1,09	0,78	0,32	0,92	1,67	1,26
6ème cycle	0,80	1,76	<u>0,87</u>	1,93	0,00	1,12	0,71	0,25	0,86	1,49	1,18
7ème cycle	0,85	1,63	0,77	1,73	0,00	0,98	0,51	0,25	<u>0,64</u>	1,32	1,08
8ème cycle	1,00	1,75	0,84	<u>1,57</u>	0,00	0,97	0,45	0,22	0,47	1,21	0,83



D) Séquence en acides aminés de l'histone H4
de gonade d'Oursin

La séquence complète en acides aminés de l'histone H4 isolée des gonades de l'Oursin *Psammechinus miliaris* est présentée dans le tableau XXII et dans la figure 1 de la publication insérée précédemment.

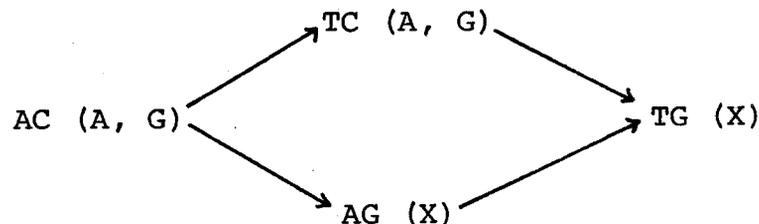
Elle a été établie d'après l'étude des peptides des fractions soluble et insoluble de l'hydrolysate tryptique de la protéine oxydée et maléylée et des peptides obtenus par hydrolyse partielle acide de la protéine native.

Cette séquence se révèle pratiquement identique à celle de l'histone H4 de thymus de Veau. Elle s'en distingue uniquement par une acétylation moindre du résidu de lysine en position 16 (20 p.100 au lieu de 50 p.100) et par le remplacement du résidu de thréonine en position 73 par un résidu de cystéine.

Cette substitution implique la mutation, au niveau du DNA, des 2 premières bases du triplet nucléotidique. Si l'on considère que 2 changements de base simultanés dans le triplet nucléotidique du DNA constituent un événement rare, on peut envisager une étape intermédiaire entre les Echinodermes et les Mammifères qui permettrait le passage de



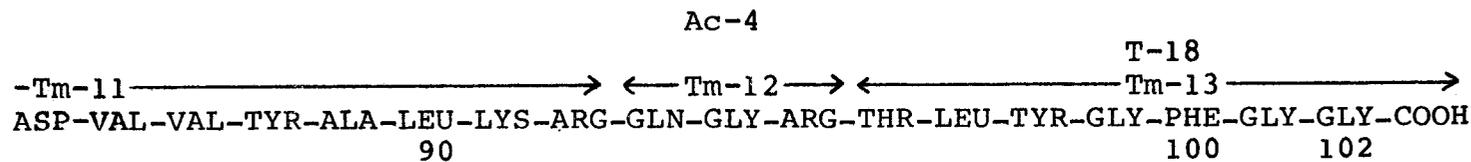
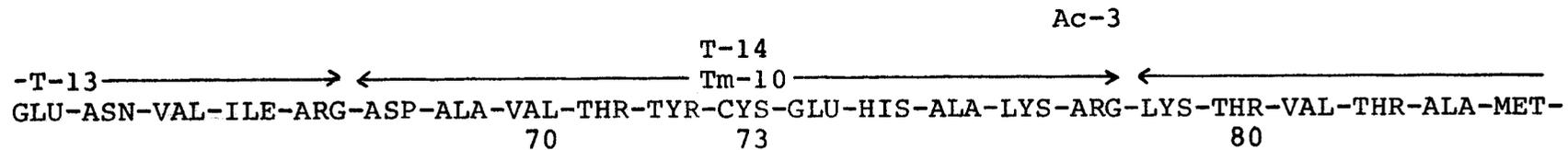
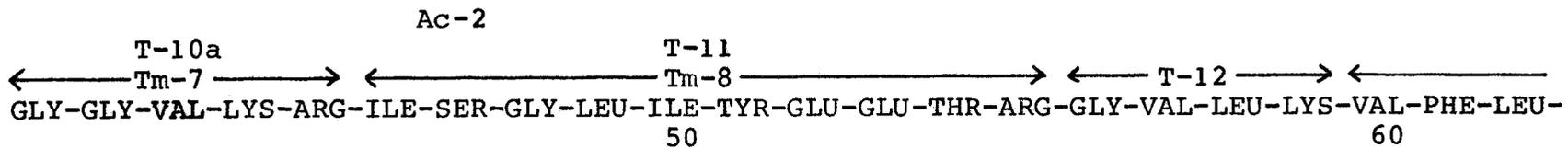
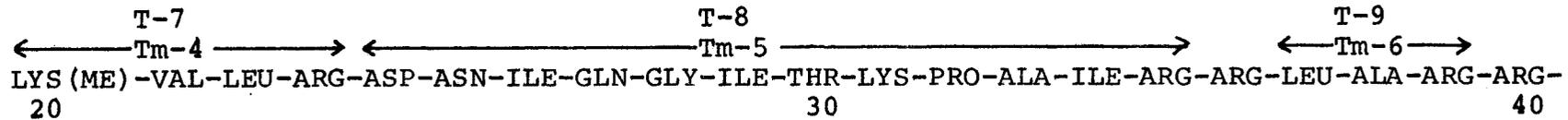
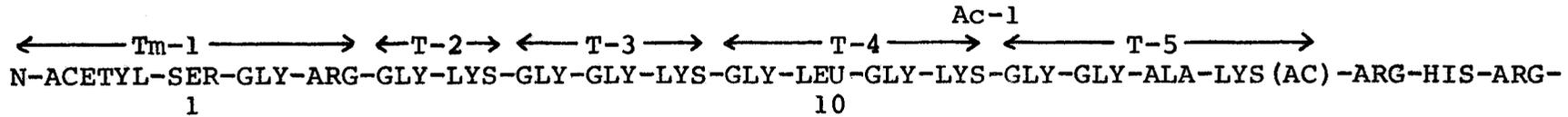
par deux transversions successives, selon le schéma suivant :

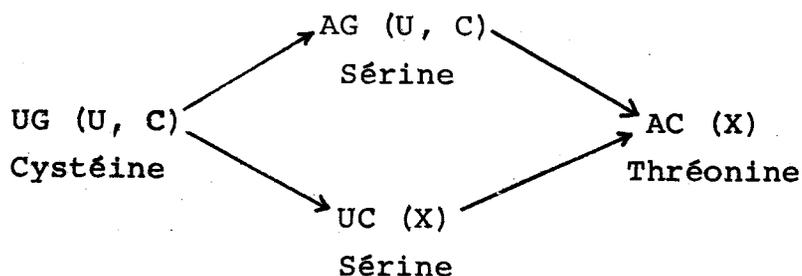


ce qui se traduit au niveau du RNA par :

TABLEAU XXII

ALIGNEMENT DES PEPTIDES ET SEQUENCE COMPLETE EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H4 DE GONADE D'OURSIN





Le remplacement d'une cystéine par une sérine a déjà été signalé dans le cas de l'histone H3. PATTHY et *al.* (1973) ont trouvé chez l'embryon de Pois l'alanine ou la sérine en position 96, au lieu de la cystéine chez le Veau.

A cette même position, HOOPER et *al.* (1973) trouvent la sérine dans l'histone H3 de Carpe et BRANDT et VON HOLT (1974) trouvent la sérine dans l'histone H3 d'érythrocytes de Poulet.

La mutation Cys-Thr intervient dans la région hydrophobe de la molécule (résidus 50 à 75) qui est normalement le siège des interactions histone-histone.

D'après les études en résonance magnétique nucléaire et dichroïsme circulaire de l'histone H4 de thymus de Veau et de ses fragments obtenus par coupure à l'acide acétique 0,25N, et les études en spectroscopie UV de l'histone H4 et du fragment 25-67, LEWIS et *al.* (1975) ont démontré que plusieurs molécules d'histone H4 pouvaient s'associer parallèlement en milieu NaCl 60 mM, avec formation d'hélice α dans la région 49-73 (25 p.100 de la protéine) et de structure β dans la région 75-102 (environ 30 p.100).

Cette association parallèle, en opposition avec les hypothèses de SMERDON et ISENBURG (1973) a été proposée par les auteurs d'après les résultats obtenus par l'étude du dimère H4 de gonade d'Oursin où l'on trouve la cystéine en position 73.

Ce dimère se comporte en RMN exactement de la même façon que le monomère de l'histone H4 de thymus de Veau, ce qui indique un type semblable d'agrégation dans le monomère et le dimère, ou encore que dans l'agrégation du monomère, les résidus 73 de chaque chaîne sont proches l'un de l'autre, ce qui ne peut se produire que si l'arrangement est parallèle.

Enfin, dans ce modèle, la partie NH₂-terminale de la protéine reste libre (33 résidus) même lors de la formation d'agrégats plus importants (figure 20).

Il a été récemment démontré que l'histone H4 pouvait aussi s'associer avec l'histone H3 et avec l'histone H2B (D'ANNA et ISENBERG, 1974) pour former un complexe équimoléculaire contenant 25 p.100 d'hélice α mais aucune structure β . On peut donc penser que dans le cas d'association H4-H4 ou d'association H4-H3 et H4-H2B, la partie COOH-terminale a une conformation différente : structure β dans le cas d'association H4-H4, pas de structure β dans les autres cas.

LEWIS et *al.* concluent que la région 73-102 de l'histone H4 est un site d'interactions avec H3 ou H2B, tandis que la région 49-73 peut être le site d'interactions avec d'autres molécules d'histone H4. La partie NH₂-terminale basique reste toujours libre, elle est le site d'interactions avec le DNA.

En fait, la présence de cystéine dans l'histone H4 de gonade d'Oursin ne modifie en rien la conformation secondaire et tertiaire de la protéine.

L'histone H3 de thymus de Veau qui renferme 2 résidus de cystéine montre au voisinage du résidu 110 une remarquable analogie de séquence avec l'histone H4 d'Oursin, qui mérite d'être soulignée (figure 3 de la publication insérée précédemment). Cette analogie a d'ailleurs été aussi signalée par STRICKLAND et *al.* (1974a). Elle peut être le reflet soit d'une origine commune à partir d'un même gène ancestral, soit d'une analogie de fonction des 2 protéines dans la chromatine, soit encore les deux à la fois.

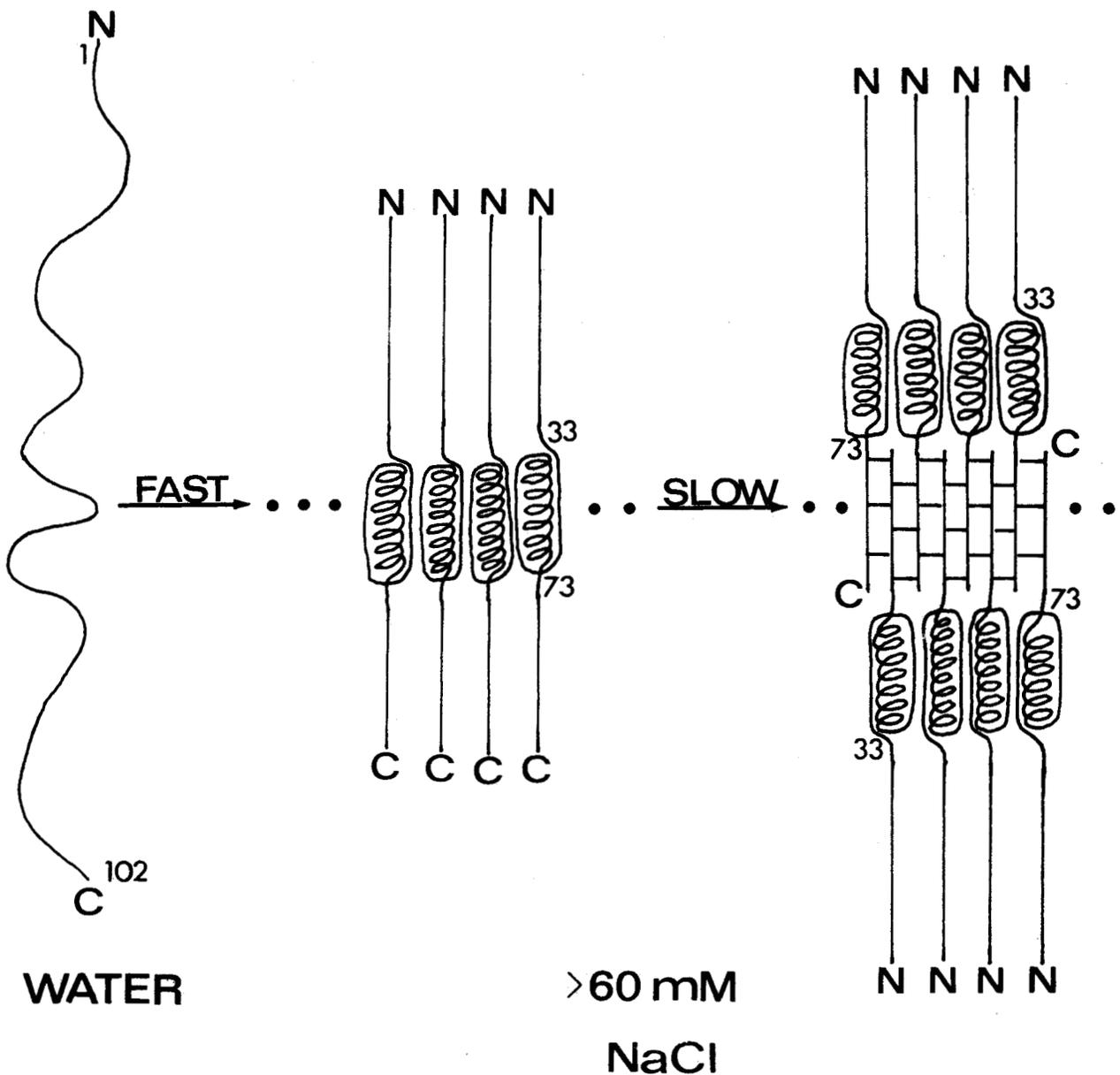


FIGURE 20

Représentation schématique des changements structuraux induits par les sels (>60 mM NaCl) dans une solution 1 mM de H4. Les deux étapes, rapide et lente, sont montrées dans une forme très étendue, pour la clareté du schéma. Elles peuvent cependant avoir une structure tertiaire plus compacte. (LEWIS et al. 1975)

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H2A ISOLEE

DES GONADES DE L'OURSIN *PSAMMECHINUS MILIARIS*

I- STRATEGIE

II- DESCRIPTION DES METHODES UTILISEES

III- RESULTATS

I- STRATEGIE

La séquence de l'histone H2A a été déterminée chez le Veau par SAUTIERE et *al.* (1972, 1974) et YEOMAN et *al.* (1972).

La composition en acides aminés de l'histone H2A isolée des gonades de l'Oursin *Psammechinus miliaris* (tableau XI, p. 76) montre des différences notables par rapport à celle de l'histone H2A de thymus de Veau, particulièrement en ce qui concerne les valeurs de la thréonine, la sérine, l'acide glutamique, la phénylalanine et l'histidine. Elle renferme 11 résidus d'arginine et 13 résidus de lysine, contre 12 et 14 respectivement chez le Veau.

Cependant, ces différences dans la composition en acides aminés sont telles qu'il n'est pas nécessaire de modifier la stratégie adoptée et mise au point pour l'histone H2A de thymus de Veau, c'est-à-dire :

A- Hydrolyse trypsique de la protéine maléylée

Le blocage de la fonction ϵ -NH₂ des 13 résidus de lysine de l'histone H2A limite l'action de la trypsine aux seules liaisons arginyles : le nombre des peptides est ainsi ramené à 12.

B- Hydrolyse chymotrypsique de la protéine maléylée

La maléylation de la fonction ϵ -NH₂ des résidus de lysine modifie la charge électrique de la protéine et détermine le dépliement de la chaîne peptidique. Ce changement de conformation spatiale de l'histone H2A permet la coupure par la chymotrypsine des liaisons tyrosyles 50 et 57, qui se situent dans la région médiane hydrophobe de la protéine (SAUTIERE, 1973).

C- Hydrolyse de la protéine par la thermolysine
afin d'obtenir des recouvrements avec les peptides tryptiques
et chymotryptiques.

II- DESCRIPTION DES METHODES UTILISEES

A) Maléylation

La technique de maléylation a été décrite à propos de l'étude de la structure primaire de l'histone H4 (voir p. 82).

B) Hydrolyses enzymatiques de la protéine

1- Hydrolyse trypsique et démaléylation

La protéine maléylée (106 mg) a été hydrolysée, en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M, pendant 4 heures, à 37°C et à pH 8,0, par la TPCk-trypsine, avec un rapport final enzyme/substrat de 1/50. L'hydrolyse est arrêtée par abaissement du pH à 3,5 avec de l'acide formique.

Pour la démaléylation, le milieu réactionnel, additionné de 2 gouttes de toluène afin d'éviter le développement de microorganismes, est maintenu à pH 3,5 et 40°C pendant 40 heures.

L'hydrolysate est ensuite lyophilisé.

2- Hydrolyse par la chymotrypsine

Après maléylation, le milieu de réaction est ajusté à pH 8,0 et la protéine maléylée (environ 6 µmoles) est soumise à l'hydrolyse par la chymotrypsine (α chymotrypsine, Worthington, CWDS), à 37°C et pendant 90 minutes. L'hydrolyse est alors arrêtée par abaissement du pH à 3,5 à l'aide d'acide formique à 70 p.100 et la démaléylation s'effectue comme précédemment.

L'hydrolysate est ensuite lyophilisé.

3- Hydrolyse par la thermolysine

L'histone H2A native (85 mg) a été hydrolysée pendant 30 minutes par la thermolysine (Thermolysine Merck), en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M de pH 8,0, à 40°C et avec un rapport final enzyme/substrat de 1/100.

L'arrêt de la réaction s'effectue par abaissement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

L'hydrolysats est alors lyophilisé.

C) Fractionnement des hydrolysats et étude des fractions peptidiques

1- Les peptides solubles des différents hydrolysats enzymatiques ont été fractionnés par chromatographie d'échanges d'ions sur une colonne de chromobeads P (résine Technicon, de type Dowex 50 x 2), éluée par un gradient de tampons volatils à base de pyridine et d'acide formique (technique décrite p. 83).

Cependant, le fractionnement des peptides tryptiques par chromatographie d'échanges d'ions a été précédé d'une séparation par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Sephadex G 25 F (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par HCl 0,01 N.

L'hydrolysats lyophilisé est dissous dans 6 ml d'HCl 0,01 N et la solution est centrifugée. Un important matériel insoluble est ainsi séparé du surnageant qui est alors déposé sur la colonne de Sephadex G 25 F. Le débit est constant de 25,6 ml par heure et les fractions collectées de 5,13 ml. Les peptides sont détectés dans l'éluat par lecture de la densité optique de chaque fraction à 220 nm.

2- Les fractions peptidiques obtenues par l'une ou l'autre méthode de fractionnement sont évaporées à sec et reprises dans 2 ml d'acide acétique à 10 p.100.

Leur homogénéité est contrôlée par électrochromatographie sur papier, comme il a été décrit p. 84.

L'étude structurale des peptides a été réalisée selon les techniques décrites dans les pages 87 à 89.

III- RESULTATS

A) Etude des peptides tryptiques solubles de la protéine maléylée

Le diagramme d'élution des peptides solubles de l'hydrolysate tryptique de l'histone H2A maléylée, fractionnés par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 25 F, est présenté dans la figure 21. Il montre la séparation des peptides en 4 fractions hétérogènes, la fraction 5 correspondant exclusivement au formiate d'ammonium.

Les fractions sont désignées par la lettre S suivie d'un chiffre indiquant leur ordre d'élution de la colonne de Sephadex.

1- La première fraction S-1 ne montre aucun peptide en électrochromatographie.

2- Les fractions S-2 et S-3 ont été purifiées par électrophorèse préparative suivie d'une chromatographie sur papier. Elles renferment un seul et même peptide de 13 résidus, le peptide Tm-2, dont la composition est présentée dans le tableau XXIV.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Gly

Dégradation de Edman : Huit cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale suivante :

Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Gly-Lys-Ala-

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une étude cinétique de l'hydrolyse de ce peptide par les carboxypeptidases B et A a permis de déterminer la séquence COOH-terminale du peptide :

-Gly-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES SOLUBLES
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H2A MALEYLEE
FRACTIONNES SUR SEPHADEX G 25 F

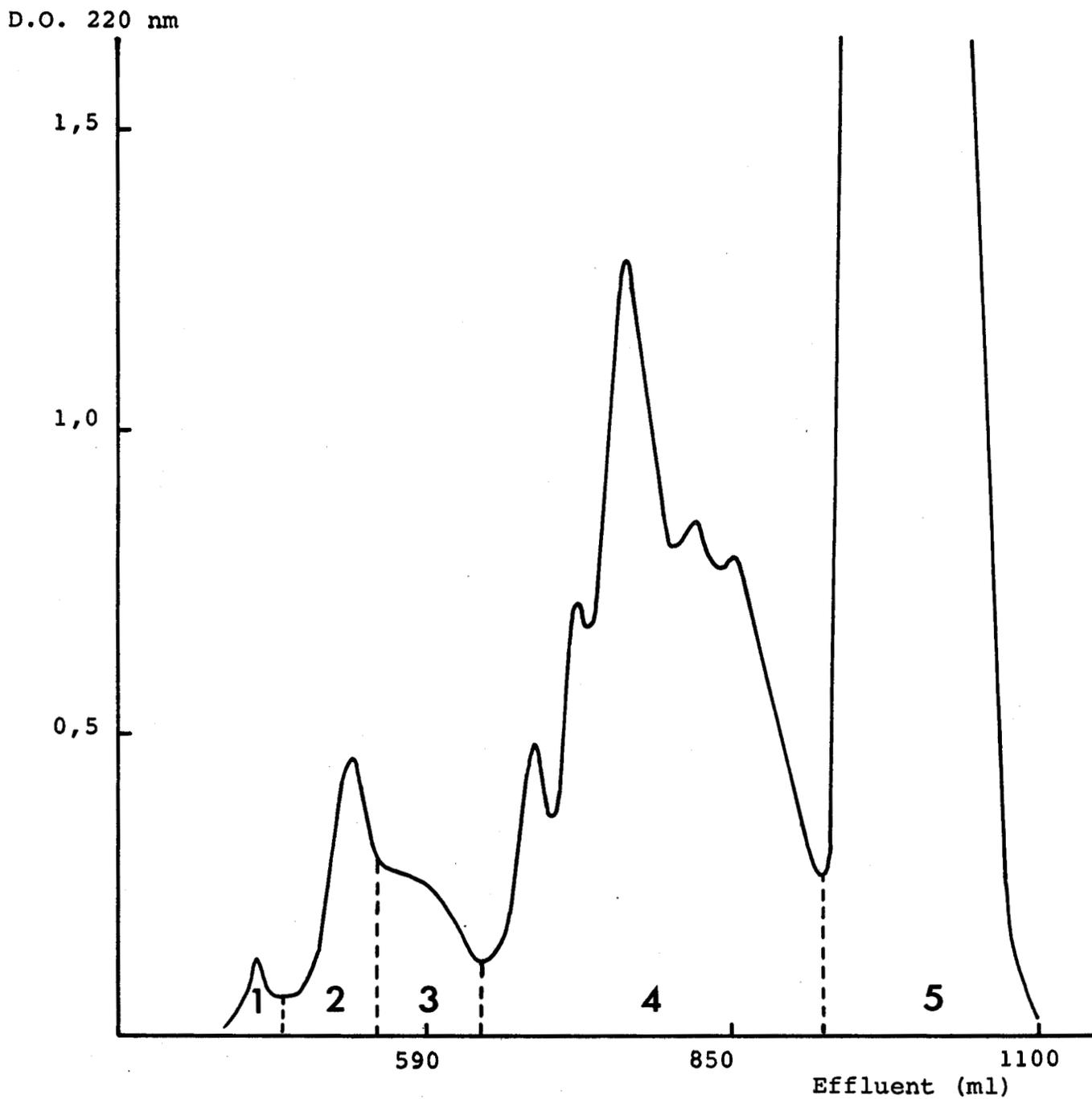


FIGURE 21



Les résultats de cette étude cinétique sont présentés dans la figure 22 et le tableau XXIII. La séquence complète du peptide Tm-2 a donc pu être établie.

3- Fraction S-4

Elle correspond à un mélange complexe de peptides de faible taille moléculaire. Elle a été lyophilisée et fractionnée par chromatographie d'échanges d'ions sur une colonne de Chromobeads P. Le diagramme d'élution est présenté dans la figure 23 et montre la séparation des peptides en 12 fractions, numérotées d'après leur ordre d'élution de la colonne.

Parmi ces 12 fractions, nous avons retrouvé 9 peptides qui ont été désignés par les lettres Tm, suivies d'un chiffre indiquant leur position dans la séquence de la protéine.

Les compositions en acides aminés et les séquences de ces peptides sont présentées respectivement dans les tableaux XXIV et XXV. Les rendements des peptides ont été calculés d'après le poids sec de protéine hydrolysée par la trypsine.

Certains de ces peptides présentent un intérêt particulier et feront l'objet d'une discussion.

Peptide Tm-1 (résidus 1 à 3)

N-Acétyl-Ser-Gly-Arg

Le peptide Tm-1 a été obtenu pur dans la fraction 1, avec un rendement de 22,3 p.100.

L'absence d'un groupe α -aminé libre mise en évidence par une réaction négative à la ninhydrine est confirmée par une réaction négative avec le chlorure de dansyle.

Cependant, grâce à son résidu d'arginine, ce peptide peut être aisément repéré par le réactif de Sakaguchi ou le réactif à la phénanthrène quinone.

Hydrolyse par la carboxypeptidase B : L'hydrolyse du peptide pendant 2 heures par la carboxypeptidase B libère 1 mole d'arginine par mole de peptide.

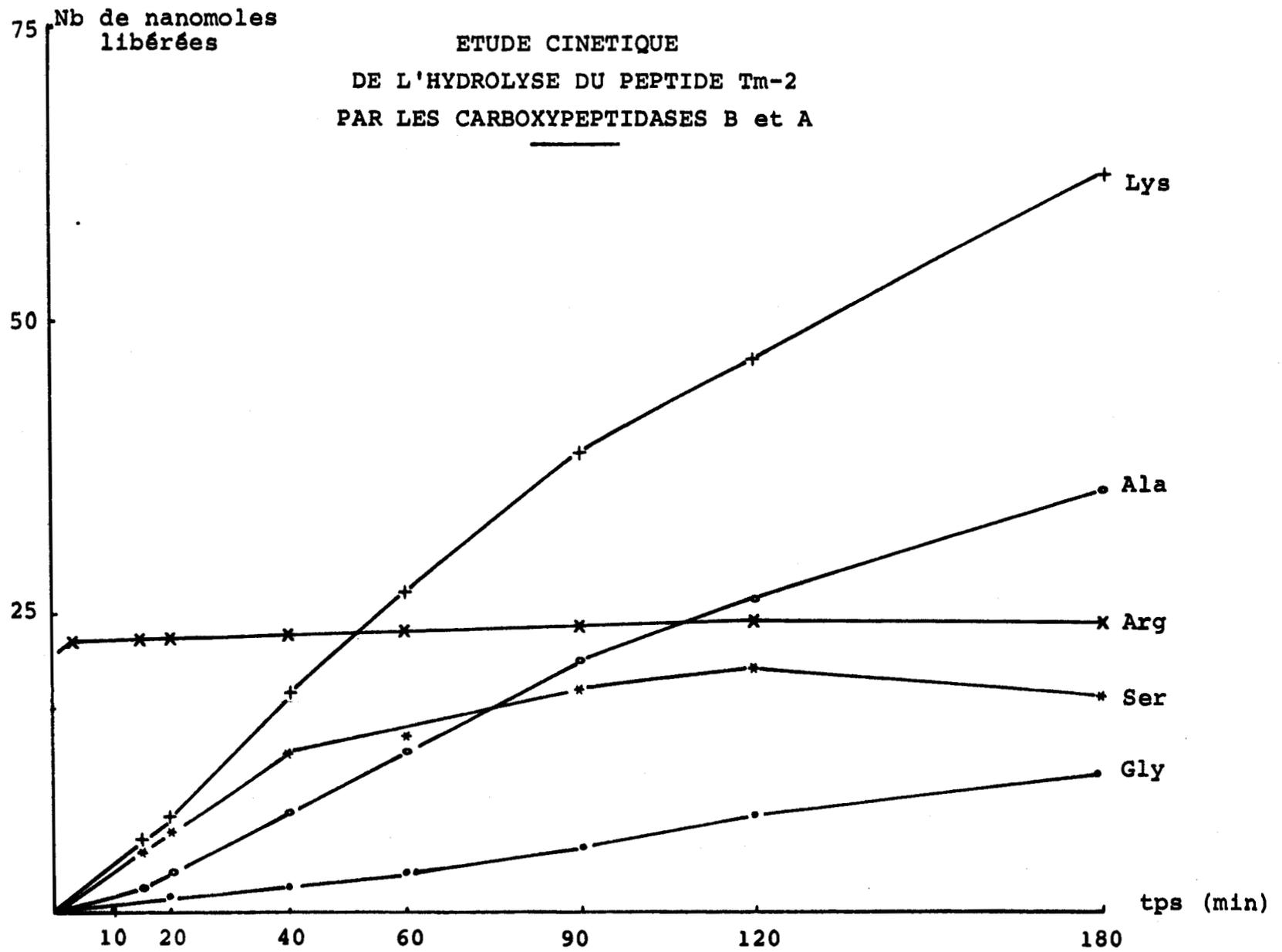


FIGURE 22



TABLEAU XXIII

ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PEPTIDE Tm-2 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES B ET A

Acides aminés	CpB 10'	CpA+B 15'	CpA+B 20'	CpA+B 40'	CpA+B 60'	CpA+B 90'	CpA+B 120'	CpA+B 180'	CpA+B 360'	CpA+B 24h
Sérine		5,06	6,69	13,58	14,69	18,62	20,52	17,91	18,51	24,28
Glycine		0,64	1,01	1,91	3,15	5,22	8,03	11,67	14,42	53,39
Alanine		1,37	2,49	8,19	12,81	21,00	26,41	35,49	39,27	78,36
Lysine		5,46	8,02	18,44	27,00	39,17	46,40	62,68	69,78	124,25
Arginine	23,86	23,44	22,79	23,67	23,25	24,15	24,22	24,19	24,22	31,07

Les résultats sont exprimés en nombre de nanomoles d'acides aminés libérées. Chaque prélèvement correspond à environ 25 nanomoles de peptide.



FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

D.O. 570 nm

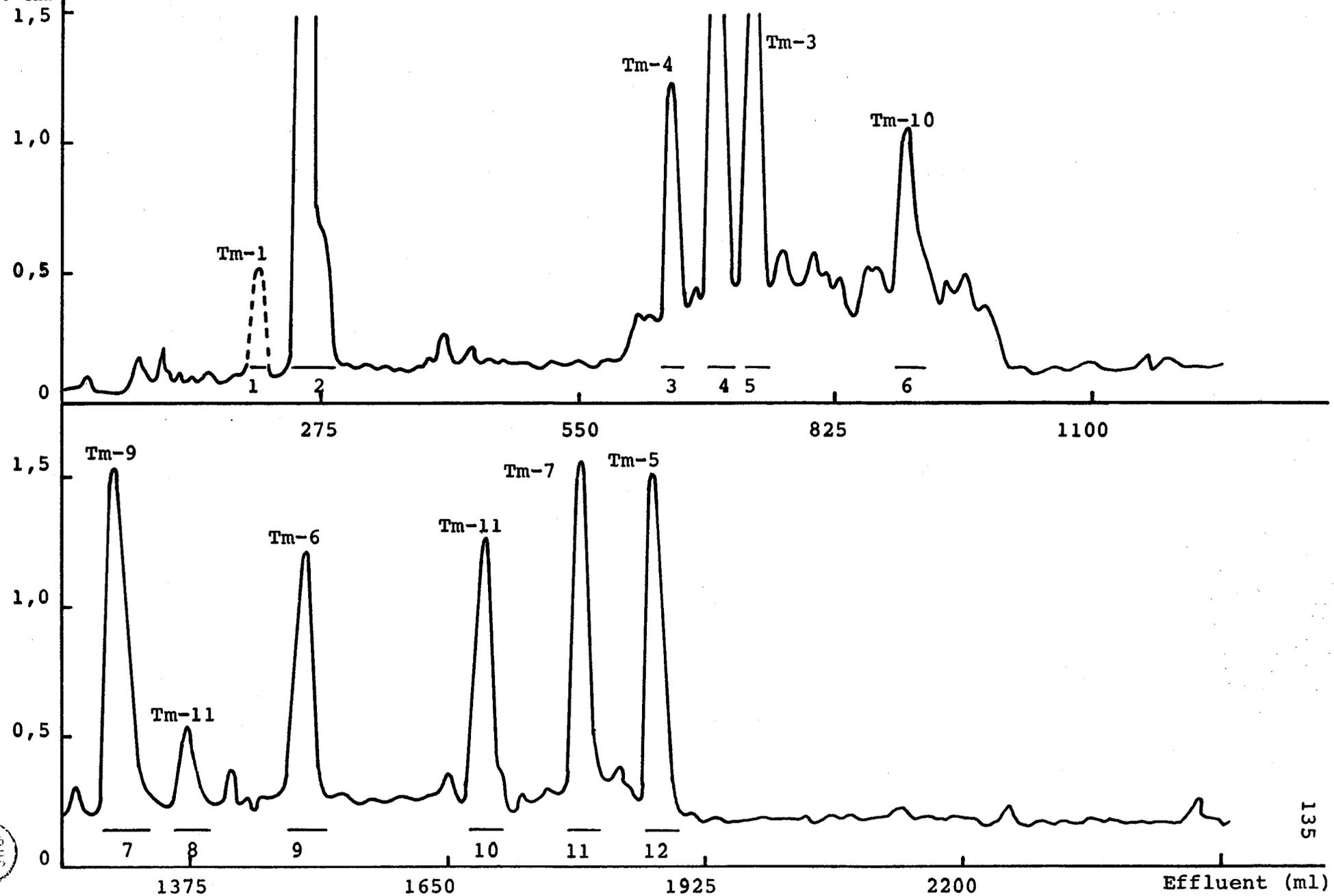


FIGURE 23

TABLEAU XXIV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES
SOLUBLES DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

(en rapports molaires par rapport à l'arginine)*

Acides aminés	Tm-1	Tm-2	Tm-3	Tm-4**
Acide aspartique				
Thréonine				
Sérine	0,90 (1)	1,01 (1)	1,77 (2)	
Acide glutamique				1,09 (1)
Proline				1,03 (1)
Glycine	0,79 (1)	3,20 (3)		2,05 (2)
Alanine		3,29 (3)		0,97 (1)
Valine				0,99 (1)
Isoleucine				
Leucine				1,01 (1)
Tyrosine				
Phénylalanine				0,98 (1)
Histidine				
Lysine		5,17 (5)		
Arginine	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Nombre de résidus	3	13	3	9
Rendement (%)	22,3	20,6	30	43
NH ₂ -terminal	Ac-Ser	Gly	Ser	Ala
COOH-terminal	Arg	Arg	Arg	Arg
N° de la fraction où le peptide a été isolé	1	S-2, S-3	5	3 et 4
Méthode de purification***		E + C	E	C et E

* Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.

** Ce peptide est retrouvé dans 2 fractions différentes, à cause de la désamidation partielle du résidu de glutamine pendant l'hydrolyse trypsique.

*** Les méthodes de purification sont indiquées de la façon suivante : E = électrophorèse préparative
C = chromatographie préparative.



TABLEAU XXIV (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES TRYPSIQUES
SOLUBLES DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

(en rapports molaires par rapport à l'arginine)*

Acides aminés	Tm-5	Tm-6	Tm-7	Tm-9
Acide aspartique			2,19 (2)	2,09 (2)
Thréonine				0,93 (1)
Sérine				
Acide glutamique				
Proline				
Glycine			1,06 (1)	
Alanine			1,03 (1)	
Valine	1,03 (1)			
Isoleucine				
Leucine		0,95 (1)		
Tyrosine			0,89 (1)	
Phénylalanine		0,87 (1)		
Histidine	0,63 (1)			
Lysine			0,88 (1)	2,00 (2)
Arginine	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Nombre de résidus	3	3	7	6
Rendement (%)	50	26	27,3	23,6
NH ₂ -terminal	Val	Phe	Lys	Asp
COOH-terminal	Arg	Arg	Arg	Arg
N° de la fraction où le peptide a été isolé	12	9	11	7
Méthode de purification**			E	C

* Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.

** Les méthodes de purification sont indiquées de la façon suivante : E = électrophorèse préparative
C = chromatographie préparative



TABLEAU XXIV (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES
 SOLUBLES DE L'HISTONE H2A MALEYLEE
 (en rapports molaires par rapport à l'arginine)*

Acides aminés	Tm-10	Tm-11**	Total	Histone H2A
Acide aspartique			4	9
Thréonine			1	3
Sérine			4	7
Acide glutamique		1,16 (1)	2	9
Proline	1,14 (1)		2	5
Glycine			7	15
Alanine		1,12 (1)	6	17
Valine			2	8
Isoleucine	1,80 (2)****	0,98 (1)	3	6
Leucine		2,08 (2)	4	15
Tyrosine			1	3
Phénylalanine			2	2
Histidine		0,85 (1)	2	2
Lysine			8	13
Arginine	1,00 (1)	1,00 (1)	10	11
Nombre de résidus	4	7	58	125
Rendement (%)	50	28,5		
NH ₂ -terminal	Ile	His		
COOH-terminal	Arg	Arg		
N° de la fraction où le peptide a été isolé	6	8 et 10		
Méthode de purification***	C + E	C		

* Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.

** Ce peptide est retrouvé dans 2 fractions différentes, à cause de la désamidation partielle du résidu de glutamine pendant l'hydrolyse trypsique.

*** Les méthodes de purification sont indiquées de la façon suivante : E = électrophorèse préparative
C = chromatographie préparative

**** Valeur obtenue après hydrolyse du peptide pendant 72 heures.



TABLEAU XXV

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES SOLUBLES DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

Tm-1	(résidus 1 à 3)	N-acétyl-Ser-Gly-Arg
* Tm-2	(résidus 4 à 16)	Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Gly-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg
Tm-3	(résidus 17 à 19)	Ser-Ser-Arg
* Tm-4	(résidus 20 à 28)	Ala-Gly-Leu-Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg
* Tm-5	(résidus 29 à 31)	Val-His-Arg
Tm-6	(résidus 32 à 34)	Phe-Leu-Arg
Tm-7	(résidus 35 à 41)	Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Asn-Arg
* Tm-9	(résidus 71 à 76)	Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg
Tm-10	(résidus 77 à 80)	Ile-Ile-Pro-Arg
* Tm-11	(résidus 81 à 87)	His-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Arg

* La séquence des peptides précédés d'un astérisque a été établie par dégradation de Edman suivie de l'identification du PTH-aminoacide libéré par chromatographie sur couche mince.

La signification des signes placés au-dessus et au-dessous des résidus d'acides aminés est indiquée dans le tableau XV, page 96.



Hydrazinolyse : L'hydrazinolyse réalisée sur le peptide, après action de la carboxypeptidase B, a permis d'identifier la glycine (0,85 mole par mole de peptide).

Le groupe acétyle qui bloque la fonction α -aminée de la sérine a été mis en évidence en spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (figure 24).

Le spectre a été effectué à LILLE, sur appareil R 32 PERKIN ELMER à 90 Mégahertz, équipé d'un calculateur NICOLET.

Peptide Tm-6 (résidus 32 à 34)

Phe-Leu-Arg

Le peptide Tm-6 est obtenu pur dans la fraction 9, avec un rendement de 26 p.100.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Phe

Dégradation de Edman : Un cycle de dégradation de Edman, suivi de la dansylation du peptide résiduel, a permis d'établir la séquence du peptide.

Peptide Tm-7 (résidus 35 à 41)

Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Asn-Arg

Le peptide Tm-7 a été obtenu par électrophorèse préparative de la fraction 11, avec un rendement de 27,3 p.100.

La présence d'asparagine dans ce peptide a été mise en évidence par hydrolyse pendant 48 heures par la leucine aminopeptidase (0,5 mg de LAP par μ mole de peptide) et analyse des acides aminés en tampon citrate de lithium 0,3N, de pH 2,56 et à 37° C.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : di-DNS-Lys

Dégradation de Edman : Six cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive nous ont permis d'établir la séquence du peptide. Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

SPECTRE DE RMN DU PROTON DU PEPTIDE N-TERMINAL N-ACETYL-SER-GLY-ARG DE L'HISTONE H2A D'OURSIN

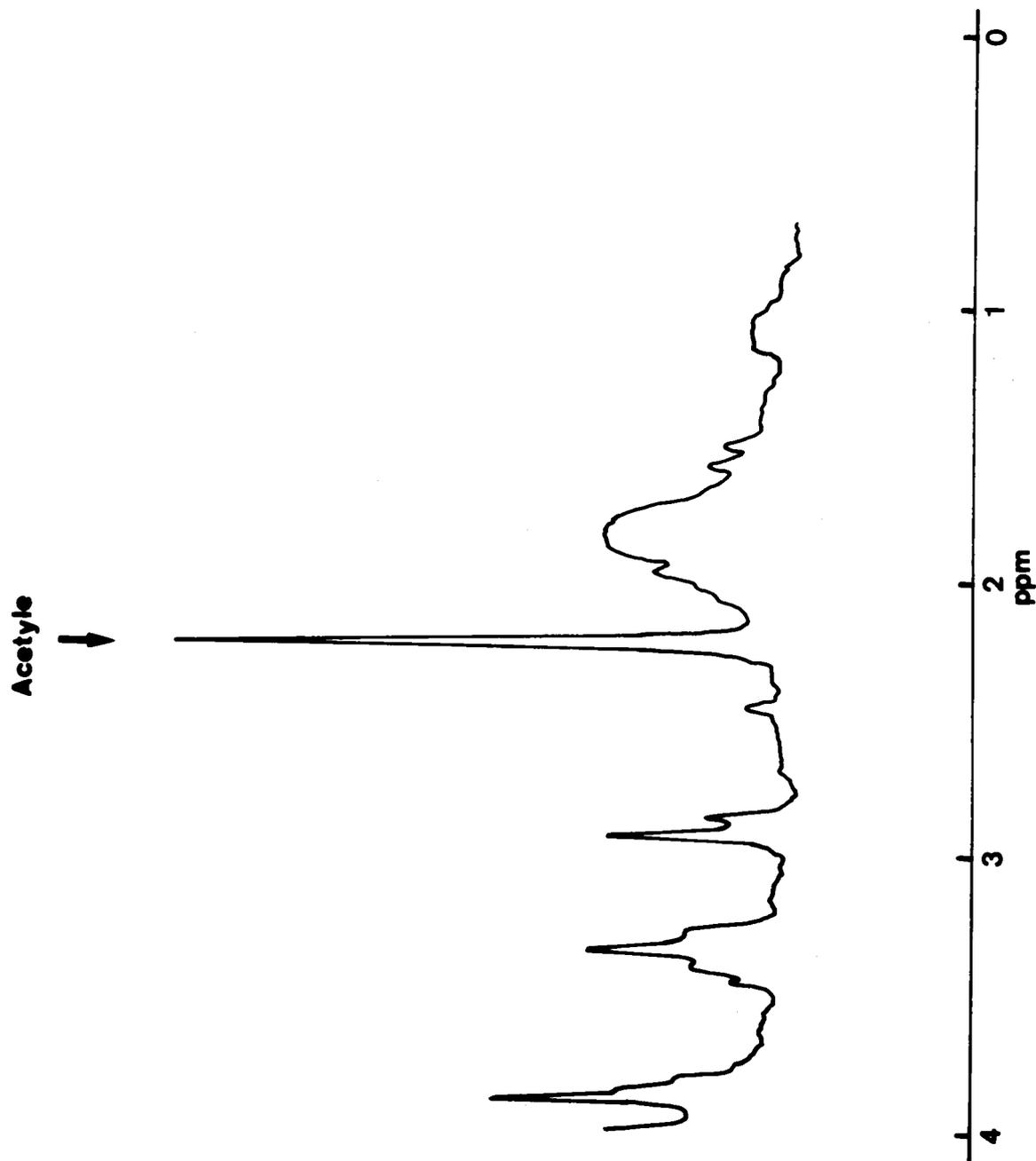


FIGURE 24

	Asp,	Gly,	Ala,	Tyr,	Lys,	Arg
Composition :	2,19	1,06	1,03	0,89	0,88	1,00
1er cycle :	1,90	1,03	0,89	0,94	<u>0,21</u>	1,00
2ème cycle :	1,86	<u>0,60</u>	0,97	0,96	0,20	1,00
3ème cycle :	<u>1,42</u>	0,50	0,96	0,88	0,18	1,00
4ème cycle :	1,21	0,43	0,90	<u>0,45</u>	0,15	1,00
5ème cycle :	1,25	0,39	<u>0,53</u>	0,32	0,13	1,00
6ème cycle :	<u>0,90</u>	0,43	0,43	0,30	0,13	1,00

Hydrolyse par les carboxypeptidases : L'hydrolyse de ce peptide par les carboxypeptidases B et A pendant 1 heure a libéré uniquement de l'arginine et de l'asparagine (déterminée par analyse d'acides aminés en tampon citrate de lithium, comme précédemment).

Le bilan des peptides de l'hydrolysats tryptique de l'histone H2A maléylée, solubles en milieu HCl 0,01 N, et obtenus par fractionnement successif sur Sephadex G 25 F et Chromobeads P, montre un déficit considérable par rapport à la protéine totale. En effet, nous obtenons un total de 58 résidus sur 125 présents dans la protéine.

Un tel déficit peut s'expliquer par l'obtention d'une importante fraction insoluble en milieu HCl 0,01 N, avant le dépôt de l'hydrolysats sur la colonne de Sephadex G 25 F (voir p. 128).

Cette fraction insoluble a été dissoute dans l'acide acétique à 30 p.100 et fractionnée sur la colonne de Sephadex G 25 F (200 x 2,5 cm), mais équilibrée et éluée cette fois par l'acide acétique à 30 p.100.

B) Etude de la fraction insoluble en milieu HCl 0,01 N de l'hydrolysate trypsique de l'histone H2A maléylée

Le diagramme d'élution obtenu par le repérage à la ninhydrine, après l'hydrolyse alcaline de chaque fraction, est présenté dans la figure 25 et montre la séparation des peptides en 2 fractions hétérogènes.

Sept peptides ont pu être isolés de ces fractions. Si la plupart ont déjà été identifiés dans la fraction soluble de l'hydrolysate (peptides Tm-4, Tm-5, Tm-6, Tm-7, Tm-9 et Tm-11), l'un d'entre eux (Tm-12) présente un grand intérêt à la fois par sa taille (38 résidus) et parce qu'il ne contient pas d'arginine.

En effet, l'absence d'arginine indique qu'il s'agit du peptide situé en position COOH-terminale dans la molécule d'histone, en raison de l'étroite spécificité de la trypsine pour les liaisons arginyles dans une protéine maléylée.

Composition en acides aminés du peptide Tm-12

Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Lys
4,01	1,80	2,86	4,29	2,12	5,21	2,46	2,97	2,03	6,00	4,70
(4)	(2)	(3)	(4)	(2)	(5)	(2)	(3)	(2)	(6)	(5)

Il a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 1 avec un rendement de 21,2 p.100.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Asp

Dégradation de Edman : Huit cycles de dégradation de Edman avec identification directe des PTH-aminoacides libérés ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale de ce peptide :

Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asn-Lys-Leu-

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une étude cinétique de l'hydrolyse du peptide Tm-12 par les carboxypeptidases B et A a permis d'établir la séquence COOH-terminale : Ser-Lys(OH).

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES
DE LA FRACTION INSOLUBLE EN MILIEU HCl 0,01N DE L'HISTONE H2A MALEYLEE
FRACTIONNES SUR SEPHADEX G 25 F

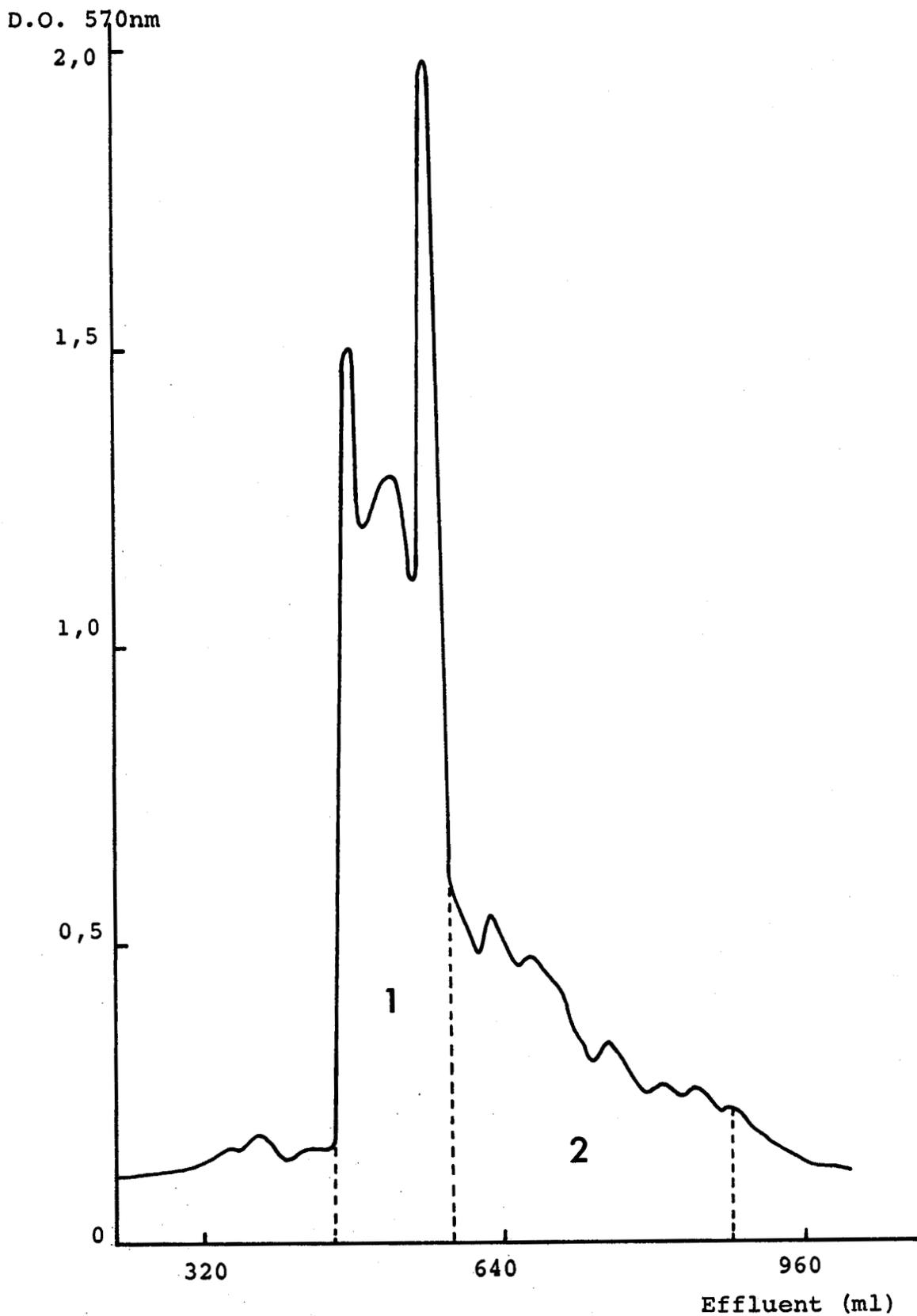


FIGURE 25



Les résultats de cette étude cinétique sont présentés dans le tableau XXVI.

Cette séquence COOH-terminale est également celle de la protéine. En effet, l'action de la carboxypeptidase B sur l'histone H2A libère de la lysine, mais aussi de la sérine. Cette libération de sérine par la carboxypeptidase B doit être imputée à la présence d'une activité carboxypeptidasique A, souvent observée dans les lots de carboxypeptidase B. Nous pouvons donc placer le peptide Tm-12 en position COOH-terminale de l'histone H2A. Le reste de la séquence de ce peptide n'a pu être déterminé, en raison de la faible quantité de matériel dont nous disposions.

Discussion

L'hydrolysate tryptique de l'histone H2A maléylée d'Oursin nous a permis de recouvrir 77 p.100 de la séquence de la protéine. Seule, la région hydrophobe (résidus 42 à 71) a échappé à nos investigations.

Cette même région hydrophobe n'a pu être isolée de l'histone H2A de thymus de Veau (SAUTIERE et *al.*, 1974), l'abondance de résidus apolaires lui conférant une insolubilité totale dans nos conditions opératoires. La séquence de cette région hydrophobe a été déterminée par l'étude des peptides chymotrypsiques et thermolysiques de la protéine.

Les peptides Tm-4 et Tm-11 qui ont été retrouvés dans 2 fractions différentes sont présents dans l'hydrolysate sous 2 formes : forme amide et forme acide obtenue par désamidation du résidu de glutamine pendant l'hydrolyse tryptique. Les résidus de glutamine et d'acide glutamique ont été respectivement identifiés sous forme de PTH-Gln et PTH-Glu.

Certains peptides tryptiques de l'histone H2A d'Oursin possèdent leur homologue dans l'hydrolysate tryptique de l'histone H2A de thymus de Veau (SAUTIERE et *al.*, 1974). Il s'agit des peptides Tm-1, Tm-3, Tm-4, Tm-5, Tm-9, Tm-10 et Tm-11.

Par contre, nous avons isolé 4 peptides qui sont absents de l'hydrolysate tryptique de l'histone H2A de Veau.

TABLEAU XXVI

ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PEPTIDE T_m-12 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES B ET A

Acides aminés	CpB 10'	CpB+A 15'	CpB+A 20'	CpB+A 40'	CpB+A 50'	CpB+A 70'	CpB+A 100'	CpB+A 130'	CpB+A 190'
Sérine			4,074	8,131	10,293	12,851	13,809	20,592	23,190
Glycine			1,938	2,184	2,405	2,678	1,322	5,133	4,652
Alanine			0,858	1,405	1,905	2,441	1,416	3,761	3,987
Lysine	12,460	13,106	11,256	12,678	13,927	15,661	14,990	19,852	21,050

Un prélèvement correspond à 20 nanomoles environ.



1- La composition en acides aminés du peptide Tm-2 d'Oursin se rapproche de celle correspondant à la séquence de l'histone H2A de Veau 4 à 17. Elle montre, en effet, la présence de 3 résidus de glycine, 3 résidus d'alanine et de 5 résidus de lysine.

Toutefois, la comparaison des 2 séquences (figure 26) met en évidence une délétion et des mutations qui sont toutes conservatives :

- délétion d'un résidu de glutamine en position 6,
- remplacement d'un résidu de glycine en position 8 par un résidu d'alanine,
- remplacement de la séquence Ala-Arg (10-11) par la séquence Gly-Lys,
- remplacement d'un résidu de thréonine en position 16 par un résidu de sérine.

2- Le peptide Tm-6 : Phe-Leu-Arg peut être rapproché du peptide Tm-7 de l'histone H2A de thymus de Veau : Leu-Leu-Arg.

La présence de ce peptide implique le remplacement du résidu de leucine en position 33 par un résidu de phénylalanine.

3- Le peptide Tm-7 d'Oursin : Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Asn-Arg se rapproche du peptide Tm-8 de Veau : Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Glu-Arg.

Le résidu d'acide glutamique en position 41 est remplacé par un résidu d'asparagine, ce qui confère à ce peptide un caractère plus basique, mis en évidence par la différence de migration en électrophorèse à pH 3,6.

4- La composition en acides aminés du peptide Tm-12 d'Oursin diffère sensiblement de celle du peptide homologue du thymus de Veau, surtout par la présence de 3 résidus de sérine, au lieu d'un seul chez le Veau, de 5 résidus de lysine,

au lieu de 7 chez le Veau, et par l'absence de résidus d'histidine, alors qu'il en existe 2 chez le Veau.

C) Etude des peptides chymotrypsiques de la protéine maléylée

L'hydrolysate chymotrypsique de l'histone H2A maléylée a été fractionné sur une colonne de Chromobeads P. Le diagramme d'élution est représenté dans la figure 27 et montre la séparation des peptides en 9 fractions. Chaque fraction, soulignée par un trait plein, est numérotée suivant l'ordre d'élution de la colonne.

Les peptides sont désignés par les lettres Chm, suivies d'un numéro qui indique leur position dans la séquence de la protéine.

Par purification des différentes fractions, nous avons obtenu 11 peptides dont les compositions en acides aminés et les séquences sont présentées respectivement dans les tableaux XXVII et XXVIII.

Peptide Chm-2 (résidus 23 à 30)

Glp-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-His

Le peptide Chm-2 dérive du peptide : Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-His par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

Dépourvu de groupe α -aminé libre, il ne réagit pas avec la ninhydrine ou le chlorure de dansyle et ne peut pas être soumis à la dégradation de Edman. Sa localisation dans l'éluate de colonne ou sur carte peptidique est assurée par la réaction de Pauly, grâce au résidu d'histidine qu'il renferme.

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse de 2 heures par la carboxypeptidase A a permis d'identifier 2 résidus : la valine et l'histidine. L'histidine a été placée en position

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

D.O. 570 nm

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

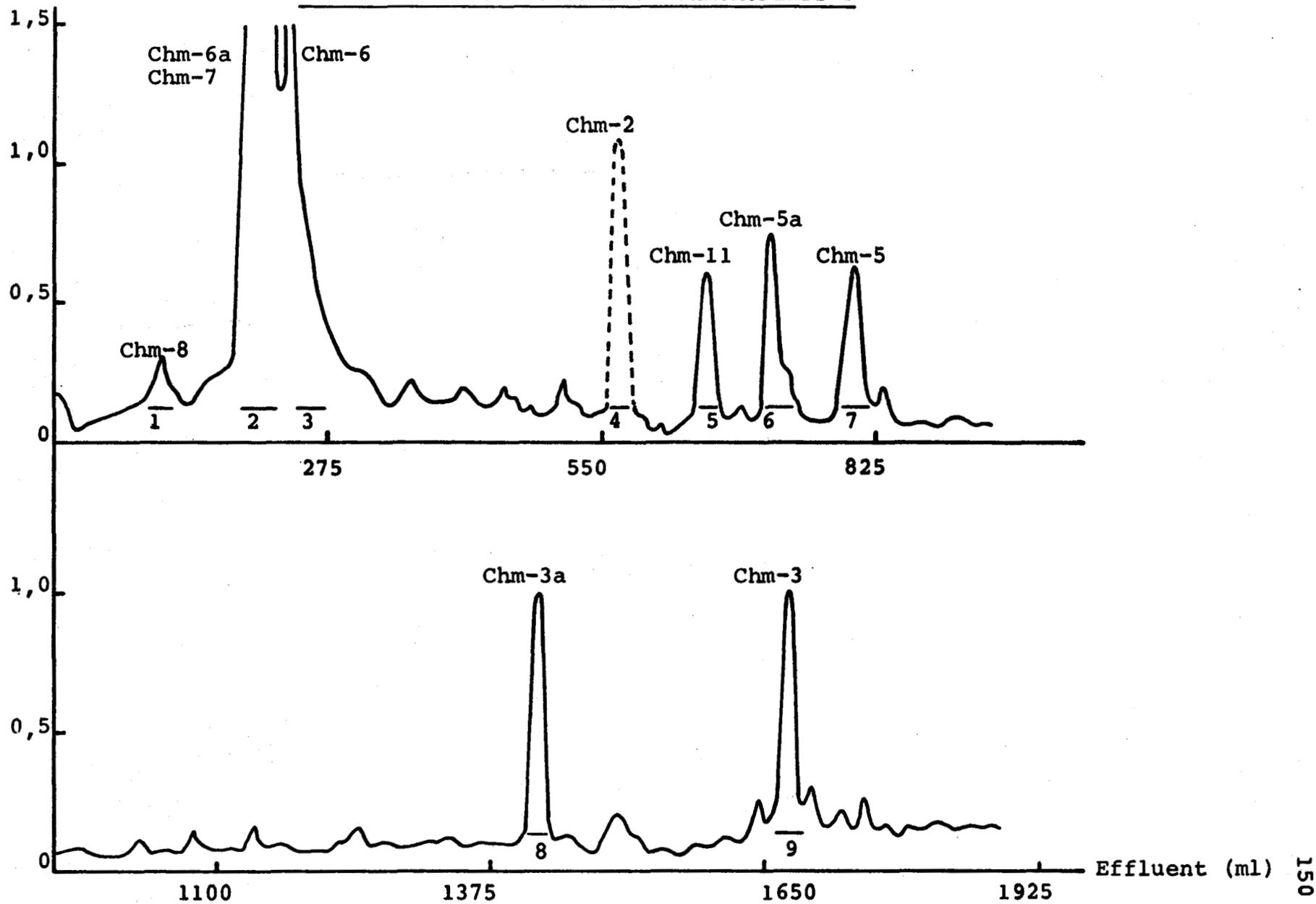


FIGURE 27

TABLEAU XXVII

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES
DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

Acides aminés	Chm-2	Chm-3	Chm-3a	Chm-5
Acide aspartique				1,04 (1)
Thréonine				
Sérine				
Acide glutamique	1,18 (1)			
Proline	1,08 (1)			0,96 (1)
Glycine	1,12 (1)			1,96 (2)
Alanine				2,67 (3)
Valine	2,14 (2)			1,92 (2)
Isoleucine				
Leucine		1,12 (1)		1,00 (1)
Tyrosine				0,85 (1)
Phénylalanine	1,05 (1)	1,01 (1)	1,00 (1)	
Histidine	1,00 (1)			
Lysine				
Arginine	1,01 (1)	0,87 (1)	0,81 (1)	0,94 (1)
Nombre de résidus	8	3	2	12
Rendement (%)	33,2	6,9	13,5	14,5
NH ₂ -terminal	bloqué (Glp)	Arg	Arg	Ala
COOH-terminal	His	Leu	Phe	Leu
N° de la fraction où le peptide a été isolé	4	9	8	7
Méthode de purification*	-	E	E	C

* Les méthodes de purification sont indiquées de la façon suivante : E = électrophorèse préparative

C = chromatographie préparative



TABLEAU XXVII (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES
DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

Acides aminés	Chm-5a	Chm-6	Chm-6a	Chm-7
Acide aspartique	1,28 (1)			
Thréonine				
Sérine				
Acide glutamique		0,92 (1)		1,01 (1)
Proline	1,00 (1)			
Glycine	2,01 (2)			
Alanine	3,35 (3)	1,73 (2)	1,84 (2)	1,98 (2)
Valine	1,99 (2)	0,90 (1)	1,09 (1)	
Isoleucine				0,77 (1)
Leucine		1,00 (1)	1,00 (1)	2,01 (2)
Tyrosine	0,93 (1)	0,80 (1)		
Phénylalanine				
Histidine				
Lysine				
Arginine	1,17 (1)			
Nombre de résidus	11	6	4	6
Rendement (%)	10,9	21,15	3	10,1
NH ₂ -terminal	Ala	Ala	Ala	Leu
COOH-terminal	Tyr	Tyr	Leu	Leu
N° de la fraction où le peptide a été isolé	6	2 et 3	2	2
Méthode de purification*	-	E + C et C	E + C	E + C

* Les méthodes de purification sont indiquées de la façon suivante : E = électrophorèse préparative
C = chromatographie préparative



TABLEAU XXVII (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES
DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

Acides aminés	Chm-8	Chm-11	Total	Histone H2A
Acide aspartique		2,82 (3)	4	9
Thréonine				3
Sérine				7
Acide glutamique	0,83 (1)	2,03 (2)	6	9
Proline			2	5
Glycine			3	15
Alanine		1,33 (1)	8	17
Valine			5	8
Isoleucine		0,89 (1)	2	6
Leucine	1,00 (1)	1,96 (2)	7	15
Tyrosine			2	3
Phénylalanine			2	2
Histidine			1	2
Lysine		1,01 (1)	1	13
Arginine		1,01 (1)	4	11
Nombre de résidus	2	11	47	125
Rendement (%)	6,15	4,5		
NH ₂ -terminal	Glu	Ala		
COOH-terminal	Leu	Leu		
N° de la fraction où le peptide a été isolé	1	5		
Méthode de purification*	C	-		

* Les méthodes de purification sont indiquées de la façon suivante : E = électrophorèse préparative
C = chromatographie préparative



TABLEAU XXVIII

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE L'HISTONE H2A MALEYLEE

Chm-2 (résidus 23 à 30)	Glp-Phe-Pro-Val- <u>Gly</u> - <u>Arg</u> - <u>Val</u> - <u>His</u>
Chm-3 (résidus 31 à 33)	<u>Arg</u> -Phe-Leu
Chm-3a (résidus 31 et 32)	<u>Arg</u> -Phe
Chm-5 (résidus 39 à 50)	<u>Ala</u> - <u>Asn</u> - <u>Arg</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Pro</u> - <u>Val</u> - <u>Tyr</u> - <u>Leu</u>
Chm-5a (résidus 39 à 49)	<u>Ala</u> - <u>Asn</u> - <u>Arg</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Pro</u> - <u>Val</u> - <u>Tyr</u>
Chm-6 (résidus 51 à 56)	<u>Ala</u> - <u>Ala</u> - <u>Val</u> - <u>Leu</u> - <u>Glu</u> - <u>Tyr</u>
Chm-6a (résidus 51 à 54)	<u>Ala</u> - <u>Ala</u> - <u>Val</u> - <u>Leu</u>
Chm-7 (résidus 57 à 62)	<u>Leu</u> - <u>Ala</u> - <u>Ala</u> - <u>Glu</u> - <u>Ile</u> - <u>Leu</u>
Chm-8 (résidus 63 et 64)	<u>Glu</u> - <u>Leu</u>
Chm-11 (résidus 85 à 95)	<u>Ala</u> - <u>Ile</u> - <u>Arg</u> - <u>Asn</u> - <u>Asp</u> - <u>Glu</u> - <u>Glu</u> - <u>Leu</u> - <u>Asn</u> - <u>Lys</u> - <u>Leu</u>

La signification des signes placés au-dessus et au-dessous des résidus d'acides aminés est indiquée dans le tableau XV, page 96.



COOH-terminale, d'après la spécificité de la chymotrypsine. La liaison histidinyl est cependant un site de coupure secondaire pour cet enzyme.

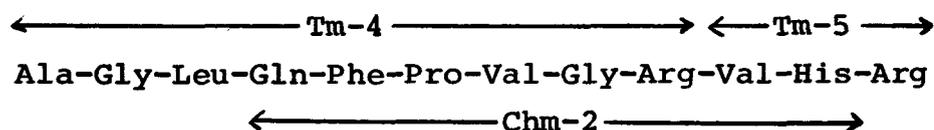
Ensuite, l'addition de carboxypeptidase B et la poursuite de l'hydrolyse pendant 2 heures ont permis d'identifier 2 nouveaux résidus : l'arginine et la glycine. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous : (ils sont exprimés en nombre de nanomoles d'acides aminés libérés et chaque prélèvement correspond environ à 75 nanomoles)

Acides aminés :	Gly,	Val,	His,	Arg
CpA 2h		83,441	75,972	
CpA 2h + CpB 2h	20,826	79,619	73,538	70,169

La séquence COOH-terminale de ce peptide a donc pu être établie dans l'ordre suivant :

-Gly-Arg-Val-His

Le peptide Chm-2 recouvre de toute évidence la partie COOH-terminale du peptide tryptique Tm-4, de même que la partie NH₂-terminale du peptide Tm-5 : Val-His-Arg, ce qui nous permet d'aligner ces 2 peptides et d'établir la séquence partielle suivante :



Nous pouvons expliquer l'absence de coupure par la chymotrypsine de la liaison phénylalanyle par la présence d'une liaison Phe-Pro. De même, l'hydrolyse par la carboxypeptidase A ne peut se poursuivre au-delà du résidu de glycine à cause de la présence du résidu de proline.

Peptide Chm-3 (résidus 31 à 33)

Arg-Phe-Leu

Le peptide Chm-3 contient le second résidu de phénylalanine de la molécule.

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman avec identification directe des PTH-aminoacides libérés nous ont permis d'établir la séquence de ce tripeptide.

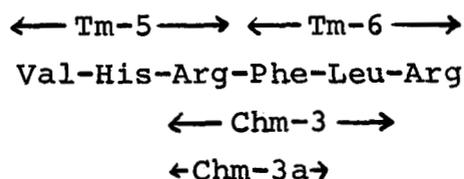
Peptide Chm-3a (résidus 31 et 32)

Arg-Phe

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Arg

La séquence de ce peptide peut être déduite de la spécificité de la chymotrypsine. Ce peptide dérive du peptide Chm-3 par hydrolyse partielle de la liaison Phe-Leu.

Nous n'avons qu'un seul peptide tryptique qui possède un résidu de phénylalanine en position NH₂-terminale. Il s'agit du peptide Tm-6 : Phe-Leu-Arg. D'autre part, un seul peptide tryptique est susceptible d'être coupé par la chymotrypsine juste avant l'arginine. Il s'agit du peptide Tm-5 : Val-His-Arg. Ceci nous permet d'établir la séquence partielle suivante :

Peptide Chm-5 (résidus 39 à 50)

Ala-Asn-Arg-Val-Gly-Ala-(Gly,Ala,Pro,Val)-Tyr-Leu

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Six cycles de dégradation de Edman avec identification directe des PTH-aminoacides libérés nous ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale du peptide :

Ala-Asn-Arg-Val-Gly-Ala-

Hydrolyse par la carboxypeptidase A : Une hydrolyse de 2 heures par la carboxypeptidase A a libéré 1 résidu de leucine et 1 résidu de tyrosine. Ils sont placés dans l'ordre Tyr-Leu par l'étude du peptide Chm-5a.

Ensuite, l'action de la carboxypeptidase A est bloquée par la présence d'un résidu de proline.

Le reste de la séquence de ce peptide a été déduit de l'étude des peptides thermolysiques.

Peptide Chm-5a (résidus 39 à 49)

Ala-Asn-Arg-(Val,Gly,Ala,Gly,Ala,Pro,Val)-Tyr

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale :

Ala-Asn-Arg-

Hydrolyse par la carboxypeptidase A : Une hydrolyse de 2 heures par la carboxypeptidase A a libéré uniquement de la tyrosine, en raison de la proximité d'un résidu de proline qui bloque l'hydrolyse.

Ce peptide dérive du peptide Chm-5 par hydrolyse partielle de la liaison Tyr-Leu.

Les 2 peptides Chm-5 et Chm-5a recouvrent la région COOH-terminale du peptide Tm-7 et permettent d'établir la séquence partielle suivante :

← Tm-7 →

Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Asn-Arg-Val-Gly-Ala-(Gly,Ala,Pro,Val)-Tyr-Leu

← Chm-5 →

← Chm-5a →

Peptide Chm-6 (résidus 51 à 56)

Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Cinq cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence complète de ce peptide.

Il est obtenu par coupure incomplète de la liaison Leu-Glu (54-55) par la chymotrypsine.

Peptide Chm-6a (résidus 51 à 54)

Ala-Ala-Val-Leu

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman suivis de la dansylation du peptide résiduel nous ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

Il recouvre la région NH₂-terminale du peptide Chm-6.

Peptide Chm-7 (résidus 57 à 62)

Leu-Ala-Ala-Glu-Ile-Leu

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Cinq cycles de dégradation de Edman, suivis de l'identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence complète en acides aminés de ce peptide.

Peptide Chm-8 (résidus 63 et 64)

Glu-Leu

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Glu

L'élution précoce du peptide Chm-8 et son comportement anodique en électrophorèse à pH 3,6 traduisent le

caractère acide de ce peptide qui relève de la présence d'un résidu d'acide glutamique. En outre, la présence d'une fonction α -aminée libre rendant possible la détection du peptide par la ninhydrine et la dansylation élimine la possibilité d'un résidu de glutamine en position NH₂-terminale dans ce dipeptide.

Peptide Chm-11 (résidus 85 à 95)

Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-(Glu,Glu,Leu,Asn)-Lys-Leu

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

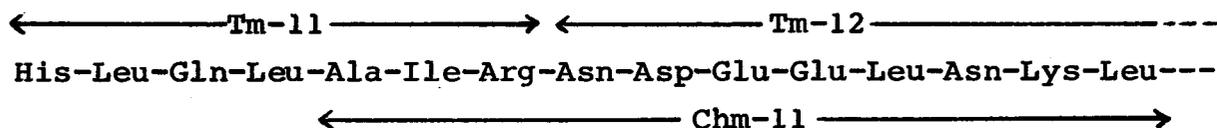
Dégradation de Edman : Cinq cycles de dégradation de Edman, suivis de l'identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale de ce peptide :

Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-

Hydrolyse par les carboxypeptidases : L'hydrolyse du peptide pendant 2 heures par la carboxypeptidase A n'a libéré qu'un résidu de leucine.

L'hydrolyse du peptide résiduel pendant 1 heure par la carboxypeptidase B a permis la libération d'un résidu de lysine.

La séquence NH₂-terminale du peptide Chm-11 recouvre la région COOH-terminale du peptide tryptique Tm-11 et la région NH₂-terminale du peptide Tm-12, ce qui nous permet d'établir la séquence partielle suivante :



Discussion

Le bilan des peptides chymotrypsiques de l'histone H2A maléylée d'Oursin fait apparaître un fort déficit puisqu'ils ne recouvrent que 47 résidus sur les 125 présents dans la molécule. Pourtant, la composition en acides aminés de la protéine (tableau XI, page 76) laissait présager de meilleurs résultats. En effet, elle montre la présence de 3 résidus de tyrosine, 2 résidus de phénylalanine et 15 résidus de leucine qui constituent 20 sites majeurs de coupure pour la chymotrypsine.

Nous avons retrouvé 2 résidus de tyrosine, les 2 résidus de phénylalanine et seulement 7 résidus de leucine. Nous pouvons noter le déficit particulièrement important des résidus de lysine : un seul résidu sur les 13 de la molécule a été retrouvé.

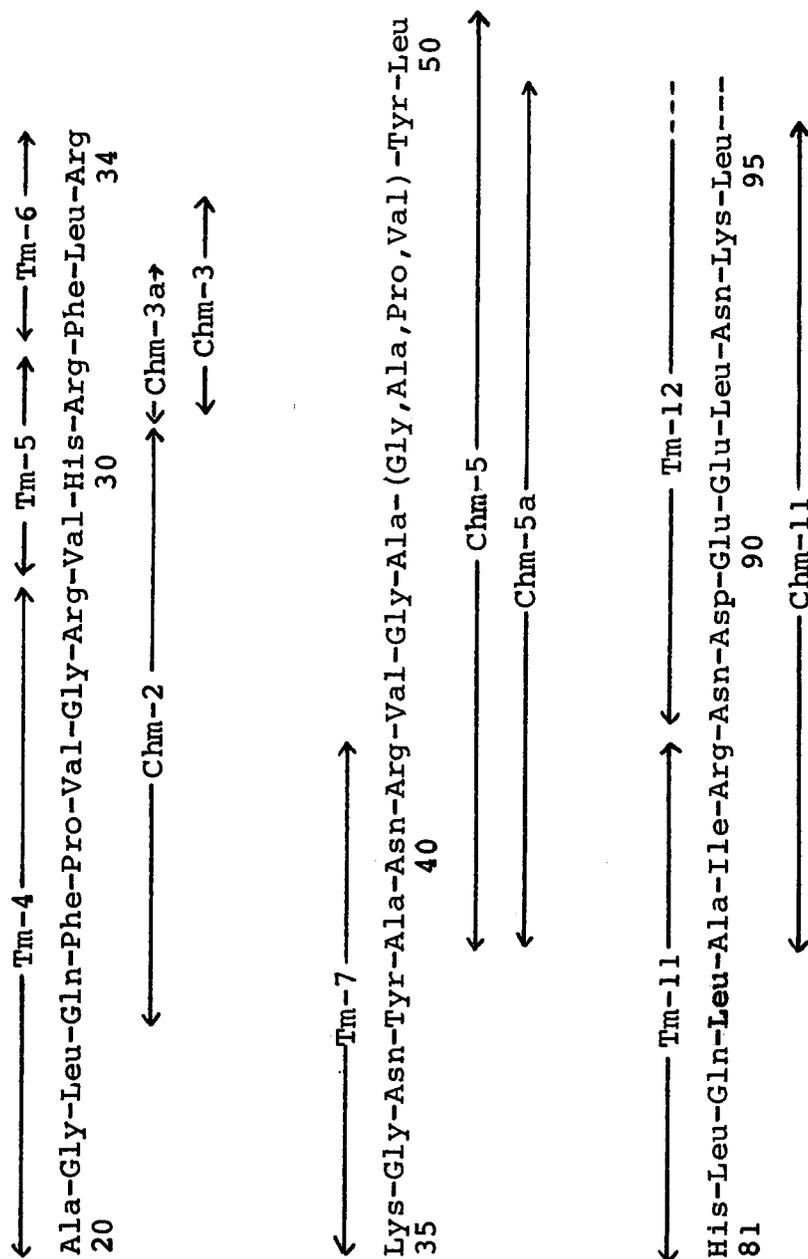
Ce déficit très important est explicable par la présence d'une fraction insoluble qui apparaît lors de la démaléylation de la protéine, après hydrolyse, et qui est éliminée par centrifugation avant le dépôt sur la colonne de chromobeads P.

Toutefois, l'étude des peptides chymotrypsiques de la protéine maléylée présente un certain intérêt : elle nous a permis de recouvrir presque entièrement la région médiane hydrophobe de la protéine (résidus 42 à 70) qui correspond au peptide tryptique insoluble Tm-8.

D'autre part, elle nous a permis d'établir de larges séquences partielles de la protéine (présentées dans le tableau XXIX) par recouvrement avec les peptides tryptiques.

TABEAU XXIX

SEQUENCES PARTIELLES OBTENUES PAR RECOUVREMENT DES PEPTIDES TRYPSIQUES ET CHYMOTRYPSIQUES



D) Etude des peptides obtenus par hydrolyse de l'histone H2A avec la thermolysine

L'hydrolysate de la protéine par la thermolysine a été fractionné sur Chromobeads P. Le diagramme d'élution est présenté dans la figure 28 et montre la séparation des peptides en 27 fractions.

Chaque fraction, représentée par un trait plein, est numérotée selon l'ordre d'élution de la colonne.

Par purification de ces différentes fractions, nous avons pu obtenir 35 peptides désignés par les lettres Th et numérotés selon leur position dans la séquence de la protéine. Les compositions en acides aminés et les séquences de ces peptides sont représentées respectivement dans les tableaux XXX et XXXI.

Peptide Th-1 (résidus 1 à 8)

Ac-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys

Le peptide Th-1 a été isolé pur de la fraction 19.

Nous n'avons pas pu identifier de dansylamino-acide NH₂-terminal. L'absence d'un groupe α -aminé libre ainsi que la présence d'un résidu de sérine et la richesse en résidus de glycine sont caractéristiques de la séquence NH₂-terminale de la protéine.

Hydrolyse par les carboxypeptidases : L'hydrolyse du peptide par la carboxypeptidase B pendant 2 heures a permis la libération d'un résidu de lysine. Ensuite, l'action de la carboxypeptidase A pendant 2 heures supplémentaires n'a libéré qu'un résidu d'alanine.

De plus, l'hydrolyse du peptide par la carboxypeptidase C pendant 30, 60, 180 et 360 minutes (figure 29) nous a permis d'identifier un résidu supplémentaire de glycine et d'établir la séquence COOH-terminale suivante :

-Gly-Ala-Lys

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

D.O. 570 nm

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

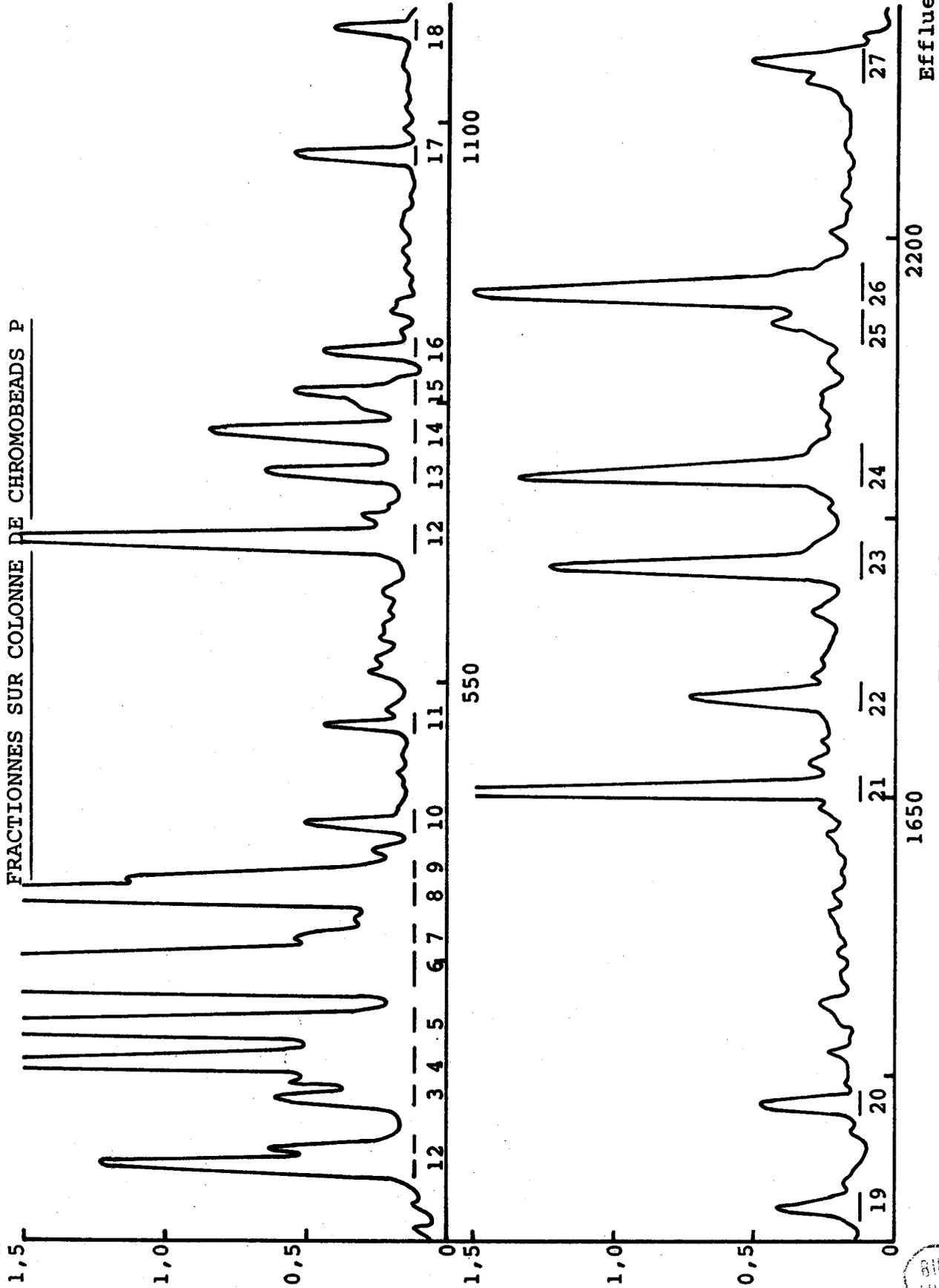


FIGURE 28



TABLEAU XXX

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

Acides aminés	Th-1	Th-3	Th-4	Th-5	Th-6	Th-6a	Th-7	Th-8	Th-8a
Asp							1,03 (1)	1,11 (1)	1,07 (1)
Thr									
Ser	0,89 (1)	0,68 (1)							
Glu			1,06 (1)						
Pro			0,97 (1)					1,00 (1)	
Gly	2,90 (3)	1,19 (1)		1,04 (1)			1,07 (1)	2,12 (2)	
Ala	0,95 (1)	1,13 (1)						2,92 (3)	0,97 (1)
Val				1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)		1,97 (2)	
Ile									
Leu			1,03 (1)				1,00 (1)		
Tyr							0,95 (1)	0,72 (1)	
Phe			0,93 (1)		1,07 (1)				
His					0,98 (1)	0,95 (1)			
Lys	2,02 (2)						1,14 (1)		
Arg	1,02 (1)	1,00 (1)		1,14 (1)	1,17 (1)	1,07 (1)	1,07 (1)	1,02 (1)	1,00 (1)
Nombre de résidus	8	4	4	3	4	3	6	11	3
Rendement	7,6%	3,1%	38,6%	20,6%	2,9%	3,1%	21%	6,9%	15,2%
N-terminal	Bloqué	Ser	Leu	Val	Val	Val	Leu	Ala	Ala
C-terminal	Lys	Gly	Pro	Arg	Phe	Arg	Tyr	Tyr	Arg



TABLEAU XXX (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

Acides aminés	Th-8b	Th-9	Th-9a	Th-9b	Th-9c	Th-10	Th-10a	Th-11	Th-11a
Asp								2,91 (3)	
Thr								0,91 (1)	1,00 (1)
Ser									
Glu		1,41 (1)		0,87 (1)	1,08 (1)	2,07 (2)	2,06 (2)		
Pro	1,05 (1)								
Gly	2,26 (2)							1,30 (1)	
Ala	2,11 (2)	1,99 (2)	2,29 (2)	2,00 (2)		2,04 (2)	1,85 (2)	3,09 (3)	
Val	1,98 (2)	0,96 (1)		1,32 (1)	0,98 (1)				
Ile						1,00 (1)	0,89 (1)		
Leu		2,00 (2)	1,00 (1)	1,08 (1)	1,02 (1)	2,01 (2)	1,05 (1)	0,77 (1)	
Tyr	0,95 (1)	0,87 (1)		0,98 (1)	0,83 (1)				
Phe									
His									
Lys								1,81 (2)	
Arg								1,70 (2)	0,98 (1)
Nombre de résidus	8	7	3	6	4	7	6	13	2
Rendement	12,5%	1,8%	10%	6,7%	24,9%	7%	3,7%	5,3%	5,2%
N-terminal	Val	Leu	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Thr
C-terminal	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Arg	Arg



COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

Acides aminés	Th-12*	Th-13	Th-13a	Th-14	Th-15	Th-15a	Th-15b	Th-15c	Th-16
Asp					2,99 (3)	2,00 (2)	3,05 (3)	1,20 (1)	0,95 (1)
Thr									
Ser					2,06 (2)	2,00 (2)	1,98 (2)		
Glu		1,20 (1)	1,17 (1)						
Pro	1,21 (1)								
Gly									2,21 (2)
Ala				1,01 (1)					1,11 (1)
Val					0,93 (1)	0,83 (1)	0,90 (1)		
Ile	2,00 (2)				1,99 (2)		1,06 (1)	2,00 (2)	2,00 (2)
Leu		2,00 (2)	1,00 (1)	1,00 (1)					
Tyr									
Phe									
His	1,10 (1)				1,08 (1)		0,71 (1)	0,76 (1)	
Lys					0,99 (1)	0,93 (1)	0,74 (1)		
Arg	1,11 (1)								
Nombre de résidus	5	3	2	2	10	6	9	4	6
Rendement	20,7%	1,5%	24%	33,2%	24,6%	7,3%	7,8%	4,25%	13,1%
N-terminal	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Ile	Leu	Leu
C-terminal	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Leu	Thr

* Valeurs obtenues après hydrolyse du peptide pendant 72 heures.

TABLEAU XXX (suite)

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

Acides aminés	Th-16a	Th-17	Th-17a	Th-17b	Th-17c	Th-18	Th-18a	Th-18b	Total	Histone H2A
Asp		1,23 (1)		1,02 (1)					9	9
Thr	1,00 (1)					1,08 (1)	0,94 (1)		3	3
Ser						2,80 (3)		2,70 (3)	5	7
Glu		2,09 (2)	1,00 (1)	1,07 (1)	1,03 (1)				9	9
Pro		0,75 (1)		0,98 (1)		0,98 (1)			5	5
Gly	2,29 (2)	2,36 (2)	2,29 (2)	1,98 (2)		1,37 (1)		1,11 (1)	14	15
Ala		1,89 (2)	0,92 (1)	1,02 (1)	1,00 (1)				15	17
Val	1,08 (1)	1,13 (1)		0,99 (1)		0,94 (1)	1,05 (1)		8	8
Ile		1,65 (2)	0,75 (1)	1,00 (1)	0,89 (1)				6	6
Leu	0,92 (1)	1,08 (1)		1,00 (1)		2,00 (2)	2,02 (2)		15*	15
Tyr									3	3
Phe									2	2
His									2	2
Lys						3,78 (4)	2,09 (2)	2,19 (2)	10	13
Arg									10	11
Nombre de résidus	5	12	5	9	3	13	6	6	116	125
Rendement	6,2%	5,1%	2%	26,1%	11,3%	5,8%	5,6%	6,2%		
N-terminal	Leu	Ile	Ile	Ile	Ile	Val	Val	Gly		
C-terminal	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys		

* En fait, le nombre de leucine recouvré par l'ensemble des peptides thermolysiques est de 17. Ce nombre reflète le recouvrement du même résidu de leucine par 2 peptides : Leu 84 (peptides Th-13 et Th-14); Leu 95 (peptides Th-15 et Th-16).



TABLEAU XXXI

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

Th-1	(résidus 1 à 8)	: Ac-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys- $\overleftarrow{\text{Gly}}\overleftarrow{\text{Ala}}\overleftarrow{\text{Lys}}$
Th-3	(résidus 18 à 21)	: $\overrightarrow{\text{Ser}}\overrightarrow{\text{Arg}}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-Gly}$
Th-4	(résidus 22 à 25)	: $\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Gln}}\overleftarrow{\text{Phe}}\overleftarrow{\text{Pro}}$
Th-5	(résidus 26 à 28)	: $\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{Gly}}\text{-Arg}$
Th-6	(résidus 29 à 32)	: $\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{His}}\overrightarrow{\text{Arg}}\text{-Phe}$
Th-6a	(résidus 29 à 31)	: $\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{His}}\text{-Arg}$
Th-7	(résidus 33 à 38)	: $\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Arg}}\overrightarrow{\text{Lys}}\overrightarrow{\text{Gly}}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-Tyr}$
Th-8	(résidus 39 à 49)	: $\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Asn}}\overrightarrow{\text{Arg}}\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{Gly}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Gly}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Pro}}\overrightarrow{\text{Val}}\overleftarrow{\text{Tyr}}$
Th-8a	(résidus 39 à 41)	: $\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-Arg}$
Th-8b	(résidus 42 à 49)	: $\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{Gly}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Gly}}\text{-Ala-Pro-Val-Tyr}$
Th-9	(résidus 50 à 56)	: $\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Glu}}\overleftarrow{\text{Tyr}}$
Th-9a	(résidus 50 à 52)	: $\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Ala}}\text{-Ala}$
Th-9b	(résidus 51 à 56)	: $\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Val}}\text{-Leu-Glu-Tyr}$
Th-9c	(résidus 53 à 56)	: $\overrightarrow{\text{Val}}\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Glu}}\text{-Tyr}$
Th-10	(résidus 57 à 63)	: $\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Glu}}\overrightarrow{\text{Ile}}\text{-Leu-Glu}$
Th-10a	(résidus 58 à 63)	: $\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Glu}}\overrightarrow{\text{Ile}}\overrightarrow{\text{Leu}}\text{-Glu}$
Th-11	(résidus 64 à 76)	: $\overrightarrow{\text{Leu}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Gly}}\overrightarrow{\text{Asn}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Ala}}\overrightarrow{\text{Arg}}\overrightarrow{\text{Asp}}\overrightarrow{\text{Asn}}\text{-Lys-Lys-Thr-Arg}$
Th-11a	(résidus 75 et 76)	: $\overrightarrow{\text{Thr}}\text{-Arg}$



La signification des signes placés au-dessus et en dessous des résidus d'acides aminés est indiquée dans le tableau XV, page 96.

TABLEAU XXXI (suite)

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR ACTION DE LA THERMOLYSINE SUR L'HISTONE H2A

Th-12	(résidus 77 à 81)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Arg}}-\overrightarrow{\text{His}}$
Th-13	(résidus 82 à 84)	:	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Leu}}$
Th-13a	(résidus 82 et 83)	:	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Gln}}$
Th-14	(résidus 84 et 85)	:	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Ala}}$
Th-15	(résidus 86 à 95)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Arg}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Leu}}$
Th-15a	(résidus 86 à 91)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Arg}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Glu}}$
Th-15b	(résidus 86 à 94)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Arg}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$
Th-15c	(résidus 92 à 95)	:	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Leu}}$
Th-16	(résidus 95 à 100)	:	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Thr}}$
Th-16a	(résidus 96 à 100)	:	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Thr}}$
Th-17	(résidus 101 à 112)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Asn}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Ala}}$
Th-17a	(résidus 101 à 105)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}$
Th-17b	(résidus 101 à 109)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Asn}}$
Th-17c	(résidus 110 à 112)	:	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Gln}}-\overrightarrow{\text{Ala}}$
Th-18	(résidus 113 à 125)	:	$\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$
Th-18a	(résidus 113 à 119)	:	$\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Thr}}$
Th-18b	(résidus 120 à 125)	:	$\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Lys}}$



ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PEPTIDE Th-1
PAR LA CARBOXYPEPTIDASE C

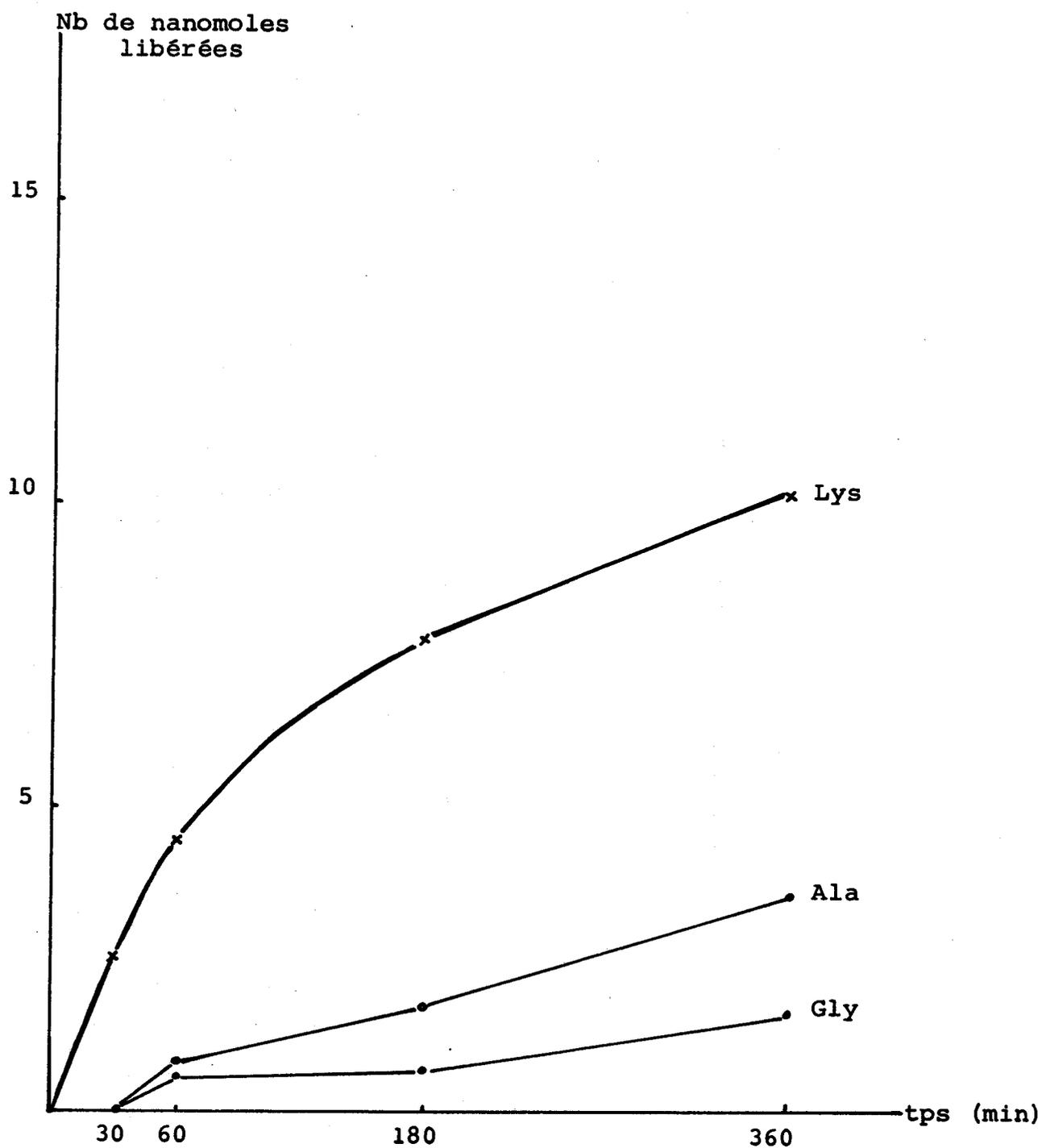
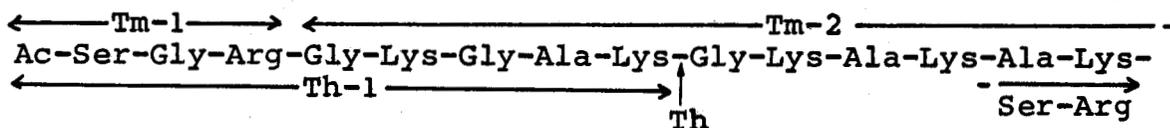


FIGURE 29



*Chaque prélèvement correspond théoriquement à 15 nanomoles.
Le faible rendement obtenu lors de cette hydrolyse est dû à
la faible activité du lot de carboxypeptidase C utilisé.*

Ce peptide Th-1 recouvre les peptides tryptiques Tm-1 et Tm-2, ce qui nous permet d'aligner ces 2 peptides dans l'ordre suivant :



Nous pouvons remarquer une coupure tout à fait inhabituelle pour la thermolysine, au niveau d'une liaison X-Gly. Toutefois, ce fait a déjà été signalé par SUNG et DIXON (1970).

Peptide Th-3 (résidus 18 à 21)

Ser-Arg-Ala-Gly

Le peptide Th-3 a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 15, où il est contaminé par le peptide Th-5.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ser

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, nous ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

	Ser,	Gly,	Ala,	Arg
Composition :	0,68	1,19	1,13	1,00
1er cycle :	<u>0,19</u>	1,04	0,91	1,00
2ème cycle :	0,43	1,00	0,84	<u>0,36</u>
3ème cycle :	0,21	0,80	<u>0,28</u>	0,28

Peptide Th-4 (résidus 22 à 25)

Leu-Gln-Phe-Pro

Le peptide Th-4 a été isolé pur de la fraction 8. Il contient l'un des 2 résidus de phénylalanine de la molécule.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, suivis de l'identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis de déterminer la séquence Leu-Gln.

Hydrazinolyse : L'hydrazinolyse du peptide a libéré 1 résidu de proline, identifié à l'analyseur d'acides aminés.

Hydrolyse par les carboxypeptidases : L'action de la carboxypeptidase C pendant 6 heures a libéré de la proline et de la phénylalanine.

La séquence du peptide a donc été établie. Elle recouvre la région médiane du peptide Tm-4 et la partie NH₂-terminale du peptide Chm-2. Nous pouvons noter une absence de coupure au niveau de la liaison X-Phe, provoquée par la présence d'un résidu de proline, situé immédiatement après le résidu de phénylalanine.

Peptide Th-5 (résidus 26 à 28)

Val-Gly-Arg

Le peptide Th-5 a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 15.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Val

Dégradation de Edman : Un cycle de dégradation de Edman, suivi de la dansylation du peptide résiduel nous a permis d'établir la séquence du peptide.

Il recouvre la partie COOH-terminale du peptide Tm-4 et la région médiane du peptide Chm-2.

Peptide Th-6 (résidus 29 à 32)

Val-His-Arg-Phe

Le peptide Th-6 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 27, avec un rendement de 3 p.100. Ce rendement particulièrement bas peut cependant s'expliquer par la coupure partielle de la liaison Arg-Phe et la forte rétention du peptide sur la colonne de Chromobeads P, cette rétention étant liée au caractère basique du peptide et à la présence d'un résidu aromatique.

Ce peptide contient le second résidu de phénylalanine de la molécule.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Val

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, nous ont permis d'établir la séquence du peptide.

	Val,	Phe,	His,	Arg
Composition :	1,00	1,07	0,98	1,17
1er cycle :	<u>0,05</u>	1,12	0,75	1,00
2ème cycle :	0,09	1,05	<u>0,05</u>	1,00
3ème cycle :	0,06	1,00	0,07	<u>0,43</u>

Ce peptide recouvre le peptide tryptique Tm-5, la partie COOH-terminale du peptide chymotryptique Chm-2 et le peptide chymotryptique Chm-3a.

Peptide Th-6a (résidus 29 à 31)

Val-His-Arg

Le peptide Th-6a a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 23.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Val

Ce peptide recouvre le peptide Th-6. Son obtention résulte d'une coupure partielle de la liaison Arg-Phe par la thermolysine.

Peptide Th-7 (résidus 33 à 38)

Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr

Le peptide Th-7 a été isolé pur de la fraction 26.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : 5 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence du peptide.

Il recouvre la région COOH-terminale du peptide tryptique Tm-6 et la région NH₂-terminale du peptide Tm-7, ce qui nous permet d'obtenir la séquence partielle suivante :

\leftarrow Tm-6 \rightarrow \leftarrow Tm-7 \rightarrow
 Phe-Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Asn-Arg
 \leftarrow Th-7 \rightarrow

Peptide Th-8 (résidus 39 à 49)

Ala-Asn-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr

Le peptide Th-8 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 14.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Neuf cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, nous ont permis d'établir la séquence du peptide. Seul, le DNS-Pro n'a pas été identifié après le 8ème cycle de dégradation. Par contre, après le 9ème cycle, nous avons pu identifier la valine.

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse du peptide pendant 2 heures par la carboxypeptidase A n'a libéré que de la tyrosine, ce qui indique un blocage de l'hydrolyse, lié à la présence d'un résidu de proline, situé immédiatement avant le résidu de valine.

Ce peptide Th-8 recouvre la région COOH-terminale du peptide tryptique Tm-7. Il est analogue au peptide chymotryptique Chm-5a. La présence d'asparagine, en position 2, a été déduite de l'étude du peptide Chm-5 (identification d'une PTH-asparagine).

Peptide Th-8a (résidus 39 à 41)

Ala-Asn-Arg

Le peptide Th-8a a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 12.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence de ce peptide, qui recouvre la région NH₂-terminale du peptide Th-8.

Peptide Th-8b (résidus 42 à 49)

Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr

Le peptide Th-8b a été isolé par électrophorèse préparative, suivie d'une chromatographie de la fraction 6.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Val

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale de ce peptide :

Val-Gly-Ala-Gly-

De toute évidence, ce peptide recouvre la région COOH-terminale du peptide Th-8.

L'obtention des peptides Th-8 et Th-8b nous permet de préciser la séquence partielle n° 2 du tableau XXIX, page 161 et d'établir la position respective des résidus :

Gly-Ala-Pro-Val-

Peptide Th-9 (résidus 50 à 56)

Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr

Le peptide Th-9 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 9, avec un rendement de 1,8 p.100. Ce rendement particulièrement bas pourra s'expliquer, par la suite, à cause des coupures partielles très nombreuses dans cette région.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Quatre cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, nous ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale du peptide :

Leu-Ala-Ala-Val-Leu-

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse du peptide pendant 2 heures par la carboxypeptidase A a permis la libération d'un résidu de tyrosine.

Les données fournies par la dégradation de Edman et l'hydrolyse par la carboxypeptidase A ont permis d'établir la séquence du peptide Th-9, le résidu d'acide glutamique ayant été placé par différence. Cette séquence recouvre la région NH₂-terminale du peptide Chm-6.

Peptide Th-9a (résidus 50 à 52)

Leu-Ala-Ala

Le peptide Th-9a a été isolé de la fraction 5, par chromatographie, suivie d'une électrophorèse préparative à pH 1,9.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Un cycle de dégradation de Edman, suivi de la dansylation du peptide résiduel, a permis de vérifier la séquence du peptide, qui recouvre de toute évidence la région NH2-terminale du peptide Th-9.

Peptide Th-9b (résidus 51 à 56)

Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr

Le peptide Th-9b a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 7.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence NH2-terminale :

Ala-Ala-Val-

Ce peptide recouvre de façon évidente la région COOH-terminale du peptide Th-9.

Peptide Th-9c (résidus 53 à 56)

Val-Leu-Glu-Tyr

Le peptide Th-9c a été isolé pur de la fraction 10.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Val

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence de ce peptide, qui recouvre de façon évidente la région COOH-terminale du peptide Th-9.

Peptide Th-10 (résidus 57 à 63)

Leu-Ala-Ala-Glu-Ile-Leu-Glu

Le peptide Th-10 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 4.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Cinq cycles de dégradation de Edman, suivis de l'identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence NH2-terminale de ce peptide :

Leu-Ala-Ala-Glu-Ile-

Peptide Th-10a (résidus 58 à 63)

Ala-Ala-Glu-Ile-Leu-Glu

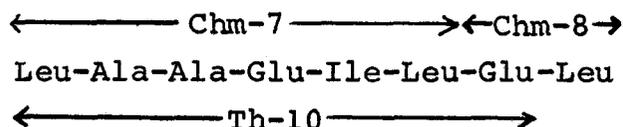
Le peptide Th-10a a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 3.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Ala

Dégradation de Edman : Quatre cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

Il recouvre la séquence du peptide chymotrypsique

Chm-7 :

Peptide Th-11 (résidus 64 à 76)

Leu-Ala-Gly-Asn-Ala-Ala-Arg-Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg

Le peptide Th-11 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 23.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Quatre cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence NH2-terminale :

Leu-Ala-Gly-Asn-

Quatre cycles supplémentaires de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la position des 5 résidus suivants :

-Ala-Ala-Arg-Asx-Asx-

La séquence COOH-terminale de ce peptide a été déduite de l'étude du peptide trypsique Tm-9 :

Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg

qui recouvre de toute évidence cette région COOH-terminale.

Nous avons également déduit de l'étude du peptide Tm-9 la présence d'un résidu d'acide aspartique et d'un résidu d'asparagine en position 8 et 9 du peptide Th-11.

Peptide Th-11a (résidus 75 et 76)

Thr-Arg

Le peptide Th-11a a été isolé pur de la fraction 16.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Thr

Le peptide Th-11a recouvre la région COOH-terminale du peptide Th-11. Son obtention implique la coupure d'une liaison X-Thr par la thermolysine. Cette coupure est plutôt mineure pour cet enzyme. Cependant, elle a déjà été signalée par SAUTIERE et *al.* (1974). Elle est due à une analogie de structure avec l'alanine.

Peptide Th-12 (résidus 77 à 81)

Ile-Ile-Pro-Arg-His

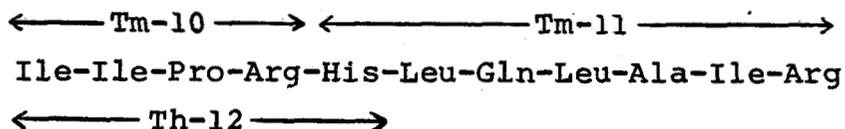
Le peptide Th-12 a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 21. Il contient l'un des 2 résidus d'histidine de la protéine. La présence d'une liaison Ile-Ile a été mise en évidence par une hydrolyse du peptide pendant 72 heures.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Quatre cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence complète de ce peptide

Le peptide Th-12 recouvre le peptide trypsique

Tm-10. De plus, la position COOH-terminale de l'histidine, juste après un résidu d'arginine, nous permet d'aligner le peptide tryptique Tm-11 qui possède un résidu d'histidine en position NH₂-terminale. Nous obtenons la séquence partielle suivante :



Peptide Th-13 (résidus 82 à 84)

Leu-Gln-Leu

Le peptide Th-13 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 7.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence du peptide. Etant donné le très faible rendement avec lequel le peptide a été obtenu, il ne nous a pas été possible d'identifier directement la glutamine, soit après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase, soit par identification des PTH-aminoacides, lors de la dégradation de Edman du peptide.

Toutefois, le caractère neutre de ce peptide peut être mis en évidence en comparant sa position d'élution de la colonne de Chromobeads et sa migration électrophorétique sur papier à pH 3,6 avec celles du peptide Leu-Gln, de composition très voisine.

Le peptide Th-13 contiendrait donc un résidu de glutamine et non un résidu d'acide glutamique.

Peptide Th-13a (résidus 82 et 83)

Leu-Gln

Le peptide Th-13a a été isolé par chromatographie suivie d'une électrophorèse préparative à pH 1,9, de la fraction 5.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont

permis d'établir la présence d'un résidu de glutamine en position COOH-terminale de ce peptide, qui fait partie de la séquence du peptide Tm-11.

Peptide Th-14 (résidus 84 et 85)

Leu-Ala

Le peptide Th-14 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 6.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Leu

Il existe dans la protéine une autre séquence Leu-Ala (résidus 50 et 51). Cependant, l'obtention du peptide Leu-Ala aurait pour corollaire l'obtention du peptide

Ala-Val-Leu-Glu-Tyr que nous n'avons pas rencontré dans l'hydro-

lysats thermolysique de la protéine. Toutefois, on ne peut pas exclure totalement cette possibilité car nous avons obtenu dans cet hydrolysats de l'alanine libre et le peptide Val-Leu-Glu-Tyr (peptide Th-9c).

53 56

Peptide Th-15 (résidus 86 à 95)

Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asn-Lys-Leu

Le peptide Th-15 a été isolé pur de la fraction 13.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Sept cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence NH2-terminale du peptide :

Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-

Peptide Th-15a (résidus 86 à 91)

Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu

Le peptide Th-15a a été isolé par chromatographie de la fraction 11.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Cinq cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, nous ont permis d'établir la séquence de ce peptide, qui recouvre la région NH₂-terminale du peptide Th-15.

Peptide Th-15b (résidus 86 à 94)

Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-Leu-Asn-Lys

Le peptide Th-15b a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 12.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Sept cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, nous ont permis d'établir la séquence de ce peptide, qui recouvre de toute évidence la région NH₂-terminale du peptide Th-15.

Peptide Th-15c (résidus 92 à 95)

Leu-Asn-Lys-Leu

Le peptide Th-15c a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 14.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

La présence d'asparagine en position 2 a été mise en évidence par étude du peptide Tm-12 dont la région NH₂-terminale est recouverte par les peptides Th-15, Th-15a, Th-15b et Th-15c.

D'autre part, les peptides Th-15, Th-15a et Th-15b recouvrent également la région COOH-terminale du peptide tryptique Tm-11.

Peptide Th-16 (résidus 95 à 100)

Leu-Leu-Gly-Gly-Val-Thr

Le peptide Th-16 a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 5.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Cinq cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence du peptide Th-16.

Peptide Th-16a (résidus 96 à 100)

Leu-Gly-Gly-Val-Thr

Le peptide Th-16a a été isolé par électrophorèse préparative, suivie d'une chromatographie de la fraction 4.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence de ce peptide qui recouvre le peptide Th-16.

Peptide Th-17 (résidus 101 à 112)

Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asn-Ile-Gln-Ala

Le peptide Th-17 a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 1.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, nous ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale du peptide :

Ile-Ala-Glx-Gly-

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse du peptide pendant 2 heures par la carboxypeptidase A a permis de libérer un résidu d'alanine.

Le reste de la séquence de ce peptide a été déduit de l'étude des peptides Th-17b et Th-17c.

Peptide Th-17a (résidus 101 à 105)

Ile-Ala-Gln-Gly-Gly

Le peptide Th-17a a été isolé par chromatographie préparative de la fraction 3.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ile

Peptide Th-17b (résidus 101 à 109)

Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asn

Le peptide Th-17b a été isolé pur de la fraction 2.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Huit cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence complète de ce peptide.

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse du peptide pendant 6 heures par la carboxypeptidase C a permis la libération d'asparagine, mise en évidence par électrophorèse sur papier à pH 1,9. La révélation de l'électrophorégramme a été réalisée par le réactif à la ninhydrine-collidine.

Ce peptide recouvre la séquence NH₂-terminale du peptide Th-17a. Nous pouvons noter une absence de coupure de la liaison Val-Leu due à la proximité d'un résidu de proline, situé immédiatement après le résidu de leucine.

Peptide Th-17c (résidus 110 à 112)

Ile-Gln-Ala

Le peptide Th-17c a été isolé par chromatographie préparative, suivie d'une électrophorèse à pH 1,9 de la fraction 5.

Dansylaminoacide NH₂-terminal : DNS-Ile

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH-aminoacides libérés, ont permis d'établir la séquence de ce peptide, de même que la présence d'un résidu de glutamine en position 2.

Ce peptide vient en position COOH-terminale du peptide Th-17.

Peptide Th-18 (résidus 113 à 125)

Val-Leu-Leu-Pro-Lys-Lys-Thr-Gly-Ser-Lys-Ser-Ser-Lys

Le peptide Th-18 a été isolé par électrophorèse préparative de la fraction 24.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Val

Dégradation de Edman : Huit cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence NH2-terminale de ce peptide :

Val-Leu-Leu-Pro-Lys-Lys-Thr-Gly-Ser-

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse du peptide pendant 2 heures par la carboxypeptidase B a permis la libération d'un résidu de lysine. La poursuite de l'hydrolyse pendant 2 heures par la carboxypeptidase A a permis la libération d'un résidu de sérine.

La séquence COOH-terminale du peptide a donc été établie : -Ser-Lys.

Elle correspond à la séquence COOH-terminale de l'histone H2A, ce qui nous permet de placer ce peptide Th-18 en position COOH-terminale de la protéine.

De même que pour le peptide Th-17, la présence d'un résidu de proline empêche la coupure de la liaison Leu-Leu par la thermolysine.

Peptide Th-18a (résidus 113 à 119)

Val-Leu-Leu-Pro-Lys-Lys-Thr

Le peptide Th-18a a été isolé pur de la fraction 18.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Val

Dégradation de Edman : Trois cycles de dégradation de Edman, suivis de la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence NH2-terminale suivante :

Val-Leu-Leu-Pro-

qui est aussi la séquence NH2-terminale du peptide Th-18.

Peptide Th-18b (résidus 120 à 125)

Gly-Ser-Lys-Ser-Ser-Lys

Le peptide Th-18b a été isolé pur de la fraction 17.

Dansylaminoacide NH2-terminal : DNS-Gly

Dégradation de Edman : Quatre cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale de ce peptide.

	Ser,	Gly,	Lys
Composition	2,7	1,11	2,19
2ème cycle	<u>1,87</u>	0,40	1,49
3ème cycle	1,60	0,31	<u>0,82</u>
4ème cycle	<u>0,96</u>	0,24	0,49

Hydrolyse par les carboxypeptidases : Une hydrolyse du peptide pendant 3 heures et 6 heures par la carboxypeptidase C a permis uniquement la libération de lysine et de sérine, comme l'indiquent les résultats exprimés ci-dessous (en nombre de nanomoles d'acides aminés libérés) :

	Cp C 3h	Cp C 6h
Sérine	2,053	5,020
Lysine	10,023	15,375

Ce peptide se place en position COOH-terminale du peptide Th-18 et donc de l'histone H2A. Il est obtenu par la coupure d'une liaison X-Gly par la thermolysine, coupure déjà signalée à propos du peptide Th-1.

Discussion

L'hydrolyse de l'histone H2A de thymus de Veau pendant 4 heures par la thermolysine, avait libéré 35 peptides "thermolysine" dont beaucoup étaient assez courts, et aussi des acides aminés libres : alanine, valine et leucine.

Nous avons voulu obtenir des peptides plus longs en limitant l'action de la thermolysine à 30 minutes sur l'histone H2A de gonade d'Oursin. Malheureusement, cette action limitée de la thermolysine nous a plutôt désavantagée car de nombreuses coupures se sont avérées partielles, multipliant le nombre des peptides et diminuant d'autant le rendement de

chacun, ce qui a rendu les études structurales assez délicates. C'est pourquoi les séquences complètes des longs peptides n'ont pu toujours être menées à terme, mais souvent déduites de l'étude des peptides dérivés.

De plus, des acides aminés libres ont aussi été obtenus : alanine, venant sans doute de la coupure partielle au niveau des résidus 84 et 85; leucine, venant sans doute de la coupure partielle au niveau des résidus 57 et 58 (voir le tableau XXXII, page 188).

L'ensemble des peptides thermolysiques que nous avons isolés et étudiés recouvre 116 des 125 résidus présents dans la protéine. L'étude des peptides thermolysiques nous a été particulièrement utile pour établir la séquence complète du peptide COOH-terminal Tm-12.

Les 9 résidus que nous n'avons pas retrouvés correspondent au peptide Th-2 qui, trop basique, a été retenu sur la colonne d'échangeur cationique malgré une élution par le tampon pyridine 2 M de pH 5,0, poursuivie pendant 24 heures.

L'obtention des peptides Th-3 et Th-11a implique respectivement la coupure d'une liaison X-Ser et d'une liaison X-Thr par la thermolysine. Ces 2 acides aminés, dont l'analogie de structure avec l'alanine est évidente, sont plutôt des sites mineurs de coupure pour la thermolysine.

Par contre, l'obtention des peptides Th-1 et Th-18b implique la coupure au niveau des liaisons X-Gly, coupure tout à fait inhabituelle pour la thermolysine.

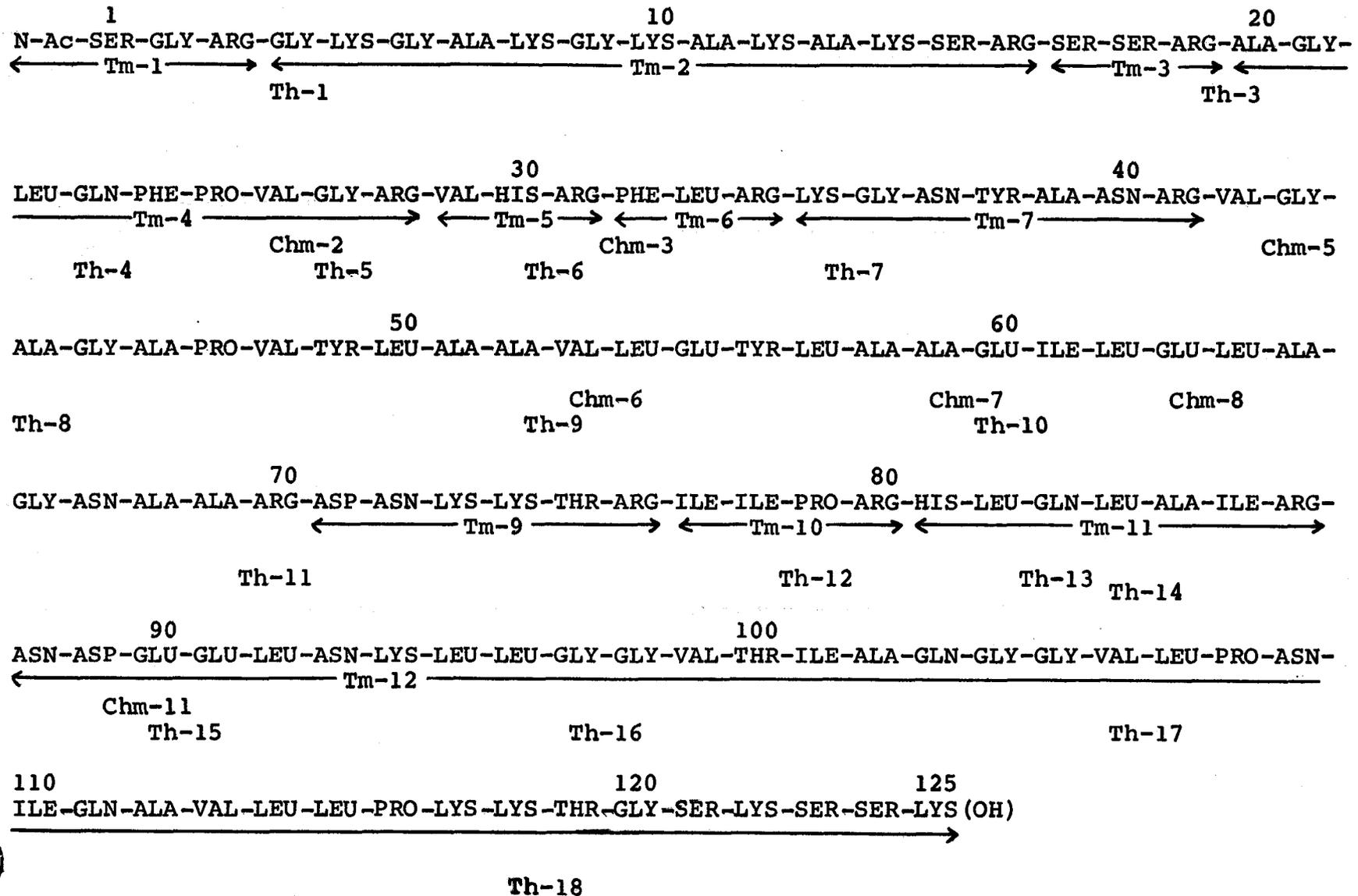
Parmi les 18 peptides thermolysiques que nous avons obtenus, 9 comprennent 1 ou plusieurs peptides dérivés, résultant de coupures partielles.

Comme SAÜTIÈRE et *al.* (1974) l'ont déjà signalé, à propos de l'histone H2A de thymus de Veau, nous avons constaté une absence de coupure par la thermolysine des liaisons de type X-Y-Pro, représentées par une flèche dans le schéma suivant :

Il s'agit des peptides :

TABLEAU XXXII

ALIGNEMENT DES PEPTIDES ET SEQUENCE COMPLETE EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H2A DE GONADE D'OURSIN



Le peptide Th-7 recouvre la séquence COOH-terminale du peptide Tm-6 et la séquence NH₂-terminale du peptide Tm-7.

Les peptides Chm-5 et Th-8 qui ne diffèrent que par un résidu de leucine, recouvrent tous deux la séquence COOH-terminale du peptide Tm-7. Le peptide Chm-5 permet d'étendre la séquence NH₂-terminale de la protéine jusqu'au résidu de leucine en position 50.

Les peptides thermolysiques Th-9 et Th-10 couvrent la moitié de la séquence de la région hydrophobe médiane de la protéine (résidus 50 à 63).

Dans cette région, seuls les peptides chymotrypsiques de la protéine maléylée auraient pu permettre le recouvrement et l'alignement des peptides thermolysiques.

Malheureusement, la chymotrypsine et la thermolysine ont un site de coupure commun - il s'agit de la liaison Tyr-Leu - et les peptides Th-9 et Th-10 ne diffèrent

56 57

respectivement des peptides Chm-6 et Chm-7 que par un seul résidu. Il ne nous a donc pas été possible d'aligner les peptides Th-9 et Th-10 autrement que par comparaison avec la séquence de l'histone H2A de thymus de Veau.

Le peptide Chm-8 permet d'aligner les peptides Th-10 et Th-11.

La séquence COOH-terminale du peptide Th-11 correspond au peptide Tm-9 : Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg.

Donc, le peptide thermolysique qui suit le peptide Th-11 doit avoir la même séquence NH₂-terminale qu'un peptide tryptique. Un seul répond à cette condition : il s'agit du peptide Th-12 : Ile-Ile-Pro-Arg-His qui possède la même séquence NH₂-terminale que le peptide Tm-10 : Ile-Ile-Pro-Arg. Nous pouvons donc aligner les peptides Th-11 et Th-12.

Le peptide Th-12 recouvre le peptide tryptique Tm-10. Il a en outre à son extrémité COOH-terminale un résidu d'histidine qui ne peut appartenir qu'au peptide Tm-11. Le peptide Th-12 permet donc de déterminer l'ordre des peptides Tm-10 et Tm-11 dans la séquence de la protéine.

Le peptide Th-15 recouvre la partie COOH-terminale du peptide Tm-11 et la partie NH₂-terminale du peptide Tm-12.

Ce peptide Tm-12, dépourvu d'arginine et de caractère très hydrophobe, occupe la position COOH-terminale dans la séquence de la protéine. Sa structure a été déduite de l'étude des peptides thermolysiques.

Les peptides Th-15 et Th-16 se recouvrent au niveau du résidu de leucine en position 95 : c'est le seul alignement compatible avec le nombre de résidus de leucine déterminé à la fois par la composition en acides aminés de la protéine et par celle du peptide Tm-12.

En effet, l'ordre Th-15—Th-17—Th-16 conduirait à l'obtention d'un résidu de leucine supplémentaire.

Le peptide Th-17 a été placé par différence immédiatement après le peptide Th-16, car le peptide Th-18 qui possède la séquence COOH-terminale Ser-Lys correspondant à la séquence COOH-terminale de la protéine, ne peut se placer qu'en position COOH-terminale dans la chaîne peptidique de l'histone H2A.

Discussion

La séquence complète de l'histone H2A d'Oursin a donc été établie. La comparaison de cette séquence avec celle de l'histone H2A de thymus de Veau fait apparaître 11 mutations et 4 délétions (tableau XXXIII).

Par souci de clarté, nous avons choisi l'histone H2A de thymus de Veau comme histone de référence, alors que logiquement, pour respecter le sens de l'évolution, nous aurions dû prendre l'histone H2A d'Oursin.

Nous pouvons observer que les mutations interviennent essentiellement dans la région NH₂-terminale (résidus 1 à 42) et dans la région COOH-terminale (résidus 121 à 129) de la protéine, régions riches en résidus basiques et, de ce fait,

TABLEAU XXXIII

NATURE ET POSITION DES MUTATIONS DANS LA STRUCTURE DE L'HISTONE H2A D'OURSIN
PAR RAPPORT A L'HISTONE H2A DE VEAU

Position	Veau	Oursin	Mutation du triplet nucléotidique correspondant du mRNA	Mutation du triplet nucléotidique correspondant du DNA
6	GLN	—		
8	GLY	ALA	GG (X) → GC (X)	CC (X) → CG (X)
10	ALA	GLY	GC (X) → GG (X)	CG (X) → CC (X)
11	ARG	LYS	AG (A,G) → AA (A,G)	TC (T,C) → TT (T,C)
16	THR	SER	AC (X) → { UC (X) AG (U,C)	TG (X) → { AG (X) TG (A,C)
33	LEU	PHE	CU (X) → UU (X)	GA (X) → AA (X)
41	GLU	ASN	GA (A,G) → AA (U,C)	CT (T,C) → TT (A,G)
59	THR	ALA	Ac (X) → GC (X)	TG (X) → CG (X)
99	LYS	GLY	AA (A,G) → GG (X)	TT (T,C) → CC (X)
99	ARG	GLY	{ AG (A,G) → GG (X) CG (X)	{ TC (T,C) → CC (X) GC (X)
121	GLU	GLY	GA (A,G) → GG (X)	CT (T,C) → CC (X)
123	HIS	—		
124	HIS	—		
126	ALA	SER	GC (X) → UC (X)	CG (X) → AG (X)
127	LYS	—		
128	GLY	SER	GG (X) → AG (U,C)	CC (X) → TC (A,G)



vraisemblablement impliquées dans les interactions électrostatiques avec les groupes phosphate du DNA.

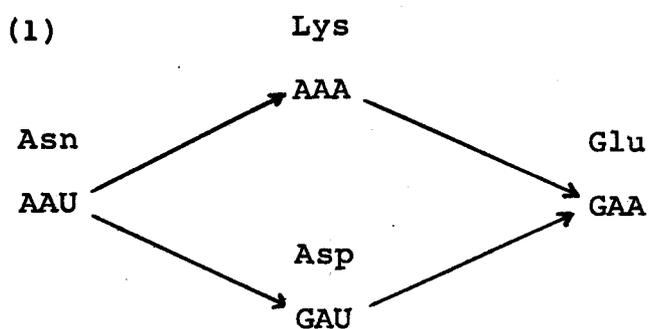
Un seul changement intervient dans la zone médiane hydrophobe de la protéine comprise entre les résidus d'arginine 42 et 71. Ce changement est d'ailleurs conservatif puisqu'un résidu d'alanine remplace un résidu de thréonine.

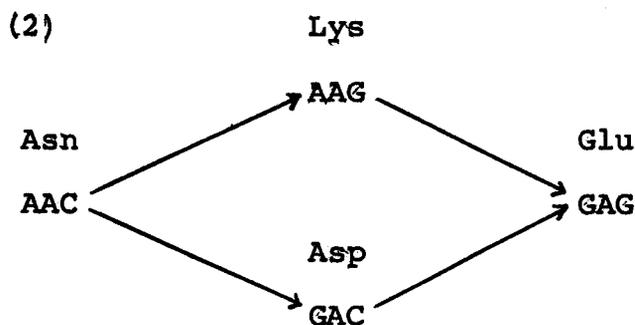
Les différentes mutations observées sont essentiellement conservatives à 3 exceptions près. En position 41, une asparagine remplace un acide glutamique; en position 99, une glycine remplace une lysine et en position 121, une glycine remplace un acide glutamique. Ces mutations sont importantes car elles entraînent une modification de charge électrique de la protéine.

Le remplacement d'une lysine par une glycine en position 99 produit l'extension de la zone hydrophobe COOH-terminale qui, chez l'Oursin, s'étend des résidus 94 à 117.

La plupart de ces mutations sont entraînées par le changement d'une seule base du DNA : première ou deuxième base du triplet nucléotidique, selon les cas (tableau XXXIII). Les mutations $C \rightleftharpoons T$ sont les plus fréquentes.

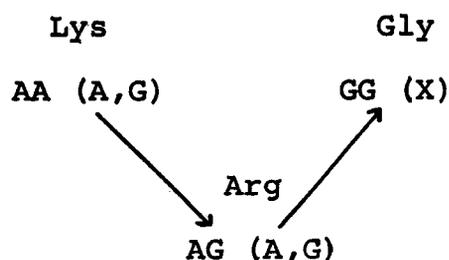
Il faut cependant signaler le remplacement, en position 41, d'une asparagine par un acide glutamique. Celui-ci entraîne la mutation de 2 bases (la première et la dernière du triplet nucléotidique). Ce fait, plutôt rare, suggère l'existence d'une étape intermédiaire avec, par exemple, le passage par l'acide aspartique ou par la lysine, ainsi que le montre le schéma suivant :





BIRNSTIEL et ses collaborateurs (communication personnelle) ont récemment déterminé dans la séquence nucléotidique du gène codant pour l'histone H2A dans l'embryon d'Oursin *Psammechinus miliaris* une séquence nucléotidique correspondant à la séquence en acides aminés s'étendant des résidus 26 à 46. Dans cette séquence, le triplet nucléotidique codant pour le résidu 40 est AAG : ce triplet ne correspond pas à l'asparagine, mais à la lysine. Notre hypothèse est ainsi confirmée.

De même, en position 99, le remplacement d'une lysine par une glycine implique le changement des 2 premières bases du triplet nucléotidique.



Là encore, on peut suggérer une étape intermédiaire passant par l'arginine, que l'on retrouve d'ailleurs en position 99 dans l'histone H2A du Veau et du Rat.

CONCLUSION

Nos travaux nous ont permis d'isoler et de caractériser les 5 histones présentes dans les gonades de l'Oursin *Psammechinus miliaris*, et d'établir la séquence en acides aminés de deux d'entre elles : l'histone H2A et l'histone H4.

A partir des études structurales que nous avons réalisées sur les histones de gonade d'Oursin, on peut faire les observations suivantes :

- La première concerne la structure primaire de l'histone H4 qui apparaît "figée" au cours de l'évolution. Nos résultats confirment les études structurales antérieures (DELANGE et *al.*, 1969b; WILSON et *al.*, 1970; SAUTIERE et *al.*, 1971a et 1971b) ainsi que les conclusions de PANYIM et *al.* (1971) tirées des études électrophorétiques des histones de Vertébrés supérieurs.

Il faut néanmoins souligner que la présence de cystéine dans l'histone H4 semble être un caractère spécifique des Echinodermes. L'histone H4 de Pois (DELANGE et *al.*, 1969b) et l'histone H4 de la Seiche *Sepia officinalis* (observation personnelle) ne renferment pas de cystéine.

- La seconde observation concerne l'histone H2A dont la structure primaire présente une certaine variabilité. Cette variabilité a non seulement été déduite des travaux de PANYIM et *al.* (1971) mais surtout des études structurales réalisées dans notre laboratoire sur les histones H2A de Rat (tumeur de chloroleucémie : LAINE et *al.*, 1976; thymus de Rat sain : LAINE, non publié), de Poulet (LAINE, non publié) et d'Oursin et par BAILEY et DIXON (1973) sur l'histone H2A de Truite (tableau XXXIV).

Un certain polymorphisme se manifeste dans l'histone H2A de Veau et de Rat. Dans d'autres espèces, comme chez

TABLEAU XXXIV

COMPARAISON DES SEQUENCES DE L'HISTONE H2A ISOLEE DE DIFFERENTES ESPECES

Position		6	8	10	11	16	33	41	78	
Espèce										
Rat	Veau	-GLN-GLY-GLY-LYS-ALA-ARG-				-THR-	-LEU-	-GLU-	-ILE-	
	Thymus					-THR/SER-				
	Tumeur CL					-THR/SER-				
	Poulet					-SER-				
	Truite	-THR-				-THR-			---	
Oursin	---	GLY-ALA-LYS-GLY-LYS-			-SER-	-PHE-	-ASN-			
Position		87	99	121			129			
Espèce										
Rat	Veau	-ILE-	-LYS/ARG-	-GLU-SER-HIS-HIS-LYS-ALA-LYS-GLY-LYS (OH)						
	Thymus		-LYS/ARG-							
	Tumeur CL		-LYS/ARG-							
	Poulet		-LYS-	-ASP-	---			128 -ALA-LYS (OH)		
	Truite	-VAL-	-GLY-		-----			126 -VAL-ALA-LYS (OH)		
Oursin		-GLY-	-GLY-SER-	-----	-LYS-SER-	-----	125 -SER-LYS (OH)			



Les délétions sont indiquées par un trait plein — .

le Siponcle *Sipunculus nudus* (A. MAZEN et M. CHAMPAGNE, communication personnelle) ou chez le Pois (J. JOHNSON, communication personnelle), ce polymorphisme se traduit par la présence de 2 histones H2A électrophorétiquement distinctes.

Un polymorphisme existe également dans l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet (GREENAWAY et MURRAY, 1971) et dans l'histone H3 de Veau (MARZLUFF et *al.*, 1972) et de Pois (PATTHY et *al.*, 1973).

1) L'étude de la structure primaire de l'histone H2A de Chloroleucémie du Rat a mis en évidence la présence de 3 histones H2A (LAINE et *al.*, 1976).

- H2A α qui possède un résidu de sérine en position 16 et un résidu de lysine en position 99 et qui représente 60 p.100 des molécules.

- H2A β 1 qui possède un résidu de thréonine en position 16 et un résidu d'arginine en position 99. Elle représente 20 p.100 des molécules.

- H2A β 2 qui possède un résidu de sérine en position 16 et un résidu d'arginine en position 99. Elle représente également 20 p.100 des molécules.

2) Cette étude a été complétée par l'étude structurale de l'histone H2A de thymus de Rat sain afin de vérifier si les modifications qui avaient été observées dépendaient de la nature tumorale du tissu ou de l'espèce animale.

Dans le thymus de Rat sain, on observe également un polymorphisme :

- H2A α qui intervient pour 33 p.100 des molécules.

- H2A β 1 uniquement qui intervient pour 66 p.100 des molécules.

3) Enfin, les études très récentes de LAINE et al. (non publié) sur l'histone H2A d'érythrocyte de Poulet ont permis de mettre en évidence 3 substitutions (un résidu de sérine remplace la thréonine, en position 16; un acide aspartique remplace un acide glutamique, en position 121 et une alanine remplace une glycine, en position 128) et la délétion d'un résidu d'histidine, en position 123.

Quant à l'histone H2A de Truite, sa structure primaire a été établie par BAILEY et DIXON en 1973. Elle met en évidence 4 délétions, 4 substitutions et une insertion par rapport à l'histone H2A de Veau (tableau XXXIV).

Il semble donc que plus on s'éloigne des Mammifères, plus l'histone H2A présente de mutations.

Ces mutations intéressent essentiellement les régions NH₂- et COOH-terminales de la séquence où les positions 16 et 99 apparaissent privilégiées. Dans les zones hydrophobes, on ne rencontre aucune mutation, à l'exception toutefois de la mutation Ala→Thr (résidu 59, dans l'histone H2A de Veau), de caractère conservatif.

Enfin, c'est dans la région COOH-terminale que l'on rencontre le plus de délétions.

Mais, le fait le plus intéressant que l'on peut tirer de cette étude comparative selon les espèces, ce sont les relations que l'on peut faire avec la structure secondaire de la molécule, relations que l'on peut aborder par 2 méthodes :

- méthodes de calculs tels que les ont développés CHOU et FASMAN (1974)
- méthodes directes d'études physicochimiques.

Si l'on considère le schéma de prévision que FASMAN et al. (1976) ont établi pour l'histone H2A (figure 30), on peut faire les constations suivantes :

1) L'histone H2A présente plusieurs types de conformation, selon les régions :

- structures en hélice α
- structures en feuillets β
- β turns ou coudes β qui sont des endroits où la protéine peut se replier sur elle-même.

2) Entre les résidus 23 et 116, la molécule présente une zone fortement structurée, où l'on peut trouver 5 feuillets β , 3 hélices α et 7 β turns.

Les autres régions, 1 à 23 et 116 à 129, présentent des structures beaucoup moins stables. Elles pourront, en effet, se déstructurer pour interagir avec le DNA.

3) Ce schéma de prévision permet d'expliquer un certain nombre d'observations faites par des méthodes physiques, qui ne sont pas toujours faciles à interpréter .

Par exemple, en RMN, on pouvait remarquer sur certaines positions des élargissements de bande qui restaient inexpliqués. En fait, si l'on considère qu'au niveau de ces positions, la structure secondaire de la molécule est en feuillets β antiparallèles, ces élargissements de bande se conçoivent aisément.

L'élargissement de bande qui était observé au niveau de la phénylalanine s'explique car la protéine ne contient qu'un seul résidu de phénylalanine, en position 25, au centre de la zone en feuillets β qui s'étend du résidu 23 au résidu 27.

En ce qui concerne l'élargissement de bande dû aux résidus d'histidine, le phénomène est beaucoup plus complexe à interpréter car l'histone H2A de Veau renferme 4 histidines. Toutefois, l'histone H2A d'Oursin qui ne renferme que 2 résidus d'histidine nous permet d'expliquer le phénomène. En effet, les études de RMN menées par BRADBURY sur l'histone H2A d'Oursin ont démontré qu'en fait, seule l'histidine en position 31 provoquait l'élargissement de bande et donc intervenait dans les interactions (BRADBURY et *al.*, 1975).

4) Ce seraient les zones en feuillets β qui seraient impliquées dans les interactions protéine-protéine. Sur le plan thermodynamique, il est bien établi que les liaisons par les feuillets β sont beaucoup plus résistantes que celles qui se font au niveau des hélices α , car il y a intervention à la fois de forces hydrophobes et de liaisons hydrogènes.

Si ce sont les feuillets β qui interviennent dans les interactions, il est intéressant de voir s'il y a des mutations dans ces régions pour l'histone H2A des différentes espèces.

En fait, une seule mutation intervient dans une zone en feuillets β . C'est la mutation en position 33 : Leucine \rightarrow Phénylalanine. Or, cette mutation ne peut entraîner aucune modification de la structure secondaire de la protéine. Donc, la conformation de la zone médiane hydrophobe est remarquablement conservée pendant l'évolution.



Ceci est également vrai pour l'histone H2B qui présente une distribution des résidus basiques et hydrophobes analogue à celle de l'histone H2A.

Les études structurales réalisées par KOOTSTRA et BAILEY sur l'histone H2B de Truite (1976) et par STRICKLAND sur les histones H2B1 et H2B2 de l'Oursin *Parechinus angulosus* (communication personnelle) ont montré que les changements par rapport à l'histone H2B de Veau interviennent presque exclusivement dans la région NH₂-terminale de la protéine (résidus 1 à 37).

Si l'on considère maintenant le schéma de structure secondaire calculé par FASMAN et *al.* (1976) pour l'histone H2B (figure 31), on peut remarquer qu'à l'instar de l'histone H2A, la structuration est beaucoup plus forte dans la zone médiane (résidus 35 à 102), région qui d'une façon potentielle, peut intervenir dans les interactions avec l'histone H2A.

De plus, les modifications qui peuvent intervenir selon les espèces dans cette zone n'affectent en aucune manière la structure secondaire de la protéine :

- région 39 à 48 Val→Ile
- région 61 à 66 Ile→Val
- région 88 à 90 Ile→Val
- Thr→Ser

A l'appui de cette hypothèse, il faut signaler les études de MARTINSON et *al.* (1976) qui montrent que les histones H2A et H2B sont liées de manière covalente pour former un dimère, après irradiation ultraviolette de la chromatine à 280 nm. La liaison s'effectue par l'intermédiaire du résidu de phénylalanine en position 25 dans l'histone H2A et du résidu de tyrosine en position 40 dans l'histone H2B, chacun de ces 2 résidus étant situé dans une zone de structure β .

Les études structurales que nous avons réalisées chez l'Oursin, sur les histones H4 et H2A, vont maintenant s'étendre aux histones H2B et H1.

L'intérêt de ces études comparatives se définit en 3 points :

- localisation des mutations dans la séquence des acides aminés.
- définition des sites d'interaction protéine-protéine et en particulier H2A-H2B, en association avec des méthodes d'études biophysiques.
- complémentarité de nos travaux de détermination de la structure primaire des histones d'Oursin *Psammechinus miliaris*, avec les travaux de BIRNSTIEL et de ses collaborateurs qui, chez le même organisme, déterminent la séquence nucléotidique des gènes codant les histones.

BIBLIOGRAPHIE

	<u>Pages</u>
AFZELIUS B. A. (1955) <u>Z. Zellforsch</u> , <u>42</u> , 134.	16
ALFAGEME C. R., ZWEIDLER A., MAHOWALD A. et COHEN L. H. (1974) Histones of Drosophila Embryos <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>249</u> , 3729-3736.	25
BAILEY G. S. et DIXON G. H. (1973) Histone II bl from Rainbow Trout. Comparison aminoacid sequence with Calf Thymus II bl. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>248</u> , 5463-5472.	7, 77, 194 197
BALDWIN J. P., BOSELEY P. G. et BRADBURY E. M., IBEL K. (1975) The subunit structure of the eukaryotic chromosome <u>Nature</u> , <u>253</u> , 245-249.	14, 15
BENTTINEN L. C. et COMB D. G. (1971) Early and late histones during Sea Urchin Development <u>J. Mol. Biol.</u> , <u>57</u> , 355-358.	28
BÖHM E. L., STRICKLAND W. N., STRICKLAND M., THWAITS B. H., VAN DER WESTHUIZEN D. R. et VON HOLT C. (1973) Purification of the five main Calf Thymus histone fractions by gel exclusion chromatography <u>FEBS Letters</u> , <u>34</u> , 217-221.	49

- BONNER J., DAHMUS M. E., FAMBROUGH D., HUANG R. C., MARUSHIGE K. et TUAN D. Y. H. (1968) 26
 The biology of isolated chromatin.
 Chromosomes, biologically active in the test tube,
 provide a powerful tool for the study of gene action
Science, 159, 47-56.
- BRADBURY E. M., CARY P. D., CRANE ROBINSON C. et RATTLE H. W. E. (1973) 13
 Conformations and interactions of histones and
 their role in chromosome structure
Ann. Acad. Sci. New York, 222, 266-289.
- BRADBURY E. M., CARY P. D., CRANE ROBINSON C., RATTLE H. W. E., BOUBLIK M. et SAUTIERE P. (1975) 198
 Conformations and interactions of histone H2A
 (F2a2, ALK)
Biochemistry, 14, 1876-1885.
- BRAM S., BUTLER-BROWNE G., BAUDY P. et IBEL K. (1975) 17, 19
 Quaternary structure of chromatin
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1043-1045.
- BRAM S. (1976) 17
 A double coil chromatin subunit model
Biochimie, 57, 1301-1306.
- BRANDT W. F. (1972) 38
Ph. D. Thesis, University of Capetown.
- BRANDT W. F., STRICKLAND W. N., MORGAN M. et VON HOLT C. (1974) 33, 38, 75, 121
 Comparison of the N-terminal aminoacid sequences
 of histone F3 from a mammal, a bird, a shark, an
 echinoderm, a mollusc and a plant
FEBS Letters, 40, 167-172.
- BUSTIN M. et COLE R. D. (1970) 32
 Regions of high and low cationic charge in a
 lysine-rich histone
J. Biol. Chem., 245, 1458-1466.
- BUTLER P. J. G., HARRIS J. I., HARTLEY B. S. et LEBERMAN R. (1969) 82
 The use of maleic anhydride for the reversible
 blocking of aminogroups in polypeptide chains
Biochem. J., 112, 679-689.

- CARY P. D., CRANE ROBINSON C., BRADBURY E. M. et
JAVAHERIAN K., 4
GOODWIN G. H. et JOHNS E. W. (1976)
Conformational studies of two Non-Histone Chromo-
somal Proteins and their interactions with DNA
Eur. J. Biochem., 62, 583-590.
- CHAUVEAU J., MOULE Y. et ROUILLER Ch. (1956) 46
Isolation of pure and unaltered liver nuclei
morphology and biochemical composition
Exp. Cell Research, 11, 317-321.
- CHOU P. Y. et FASMAN G. D. (1974) 197
Conformational parameters for amino acids in helical,
 β sheet and random coil regions calculated from
proteins
Biochemistry, 13, 211-221.
- COHEN H. et GOTCHEL B. V. (1971) 25
Histones of polytene and nonpolytene nuclei of
Drosophila melanogaster
J. Biol. Chem., 246, 1841-1848.
- COZCOLLUELA C. et SUBIRANA J. A. (1968) 31
Somatic histones from *Mytilus edulis*
Biochim. Biophys. Acta, 154, 242-244.
- D'ANNA J. A. et ISENBERG I. (1974) 12, 122
A histone cross-complexing pattern
Biochemistry, 13, 4992-4997.
- DELANGE R. J., FAMBROUGH D. M., SMITH E. L. et 76
BONNER J. (1968)
Calf and Pea Histone IV.
I- Aminoacid compositions and the identical
COOH-terminal 19-residues sequence
J. Biol. Chem., 243, 5906-5913.
- DELANGE R. J., FAMBROUGH D. M., SMITH E. L. et 4, 7, 42,
BONNER J. (1969a) 80, 83, 95
Calf and Pea Histone IV.
II- The complete aminoacid sequence of Calf
Thymus histone IV : presence of ϵ -N-acetyllysine
J. Biol. Chem., 244, 319-334.
- DELANGE R. J., FAMBROUGH D. M., SMITH E. L. et 7, 42, 77,
BONNER J. (1969b) 80, 194
Calf and Pea Histone IV.
III- Complete aminoacid sequence of pea seedling
histone IV. Comparison with the homologous calf
thymus histone
J. Biol. Chem., 244, 5669-5679.

- DELANGE R. J., HOOPER J. A. et SMITH E. L. (1972) 75
Complete aminoacid sequence of Calf Thymus Histone III
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 882-884.
- DELANGE R. J., HOOPER J. A. et SMITH E. L. (1973) 4, 7, 38
Histone III -
III- Sequence studies on the cyanogen bromide peptides:
complete aminoacid sequence of Calf Thymus Histone III
J. Biol. Chem., 248, 3261-3274.
- DICK C. et JOHNS E. W. (1969) 25
Histone from *Drosophila melanogaster*
Comp. Biochem. Physiol., 31, 529-533.
- DIXON G. H. et SMITH M. (1968) 33
Nucleic Acids and Protamine in Salmon Testes
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 8, 9-34.
- DOUVAS A. S., HARRINGTON C. A. et BONNER J. (1975) 2
Major Non Histone Proteins of Rat Liver Chromatin:
Preliminary identification of myosin, actin, tubulin
and tropomyosin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3902-3906.
- EASLEY C. W., ZEGERS B. J. M. et DE VIJLDER M. (1969) 86, 89
Application of specialized techniques for specific
staining of peptide maps on various media
Biochim. Biophys. Acta, 175, 211-213.
- EDMAN P. et SJÖQUIST J. (1956) 88, 89
Identification and semi-quantitative determination
of phenylthiohydantoïns
Acta Chem. Scand., 10, 1507-1509.
- ELGIN S. C. R. et BONNER J. (1970) 2
Limited heterogeneity of the Major Non Histone
Chromosomal Proteins
Biochemistry, 9, 4440-4447.
- ELGIN S. C. R. et BONNER J. (1972) 2
Partial fractionation and chemical characterization
of the Major Non Histone Chromosomal Proteins
Biochemistry, 11, 772-781.
- EVANS L. E. et OZAKI H. (1973) 28
Nuclear histones of unfertilized sea urchin eggs
Exptl. Cell Res., 79, 228-231.

- FASMAN G. D., CHOU P. Y. et ADLER A. J. (1976) 197, 199
Prediction of the conformation of the histones
Biophysical Journal, 16, 1201-1238.
- FINCH J. T., NOLL M. et KORNBERG R. D. (1975) 17
Electron microscopy of defined lengths of chromatin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3320-3332.
- FINCH J. T. et KLUG A. (1976) 19
Solenoidal model for superstructure in chromatin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1897-1901.
- GERMOND J. E., HIRT B., OUDET P., GROSS-BELLARD M. et
CHAMBON P. (1975) 16
Folding of the DNA Double Helix in Chromatin-like
Structures from Simian Virus 40
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1843-1847.
- GLISIN V. R., GLISIN M. V. et DOTY P. (1966) 26
The nature of messenger RNA in the early stage of
sea urchin development
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 56, 285-289.
- GOODWIN G. H., SANDERS C. et JOHNS E. W. (1973) 3
A new group of chromatin-associated proteins with a
high content of acidic and basic aminoacids
Eur. J. Biochem., 38, 14-19.
- GOUREVITCH M., PUIGDOMENECH P., CAVE A., ETIENNE G.,
MERY J. et PARELLO J. (1974) 13
Model studies in relation to the molecular structure
of chromatin
Biochimie, 56, 967-985.
- GRAY W. R. et HARTLEY B. S. (1963) 87
A fluorescent end-group reagent for proteins and
peptides
Biochem. J., 89, 59P-60P.
- GREENAWAY P. J. et MURRAY K. (1971) 8, 196
Heterogeneity and polymorphism in chicken
erythrocyte histone fraction V
Nature, New Biol., 229, 233-238.
- GROS C. et LABOUESSE B. (1969) 88
Study of the dansylation reaction of aminoacids,
peptides and proteins
Eur. J. Biochem., 7, 463-470.

- HAMER D. (1955) 31
Biol. Bull., 108, 35.
- HEWISH D. R. et BURGOYNE L. A. (1973) 14
 Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin
 DNA at regularly spaced sites by a nuclear DNase
Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 504-510.
- HIRS C. H. W., MOORE S. et STEIN W. H. (1956) 144
 Peptides obtained by tryptic hydrolysis of perfor-
 mic acid-oxidized ribonuclease
J. Biol. Chem., 219, 623-642.
- HIRS C. H. W., MOORE S. et STEIN W. H. (1960) 88
 The sequence of the aminoacid residues in perfor-
 mic acid-oxidized ribonuclease
J. Biol. Chem., 235, 633-647.
- HIRS C. H. W. (1967) 82
 dans " Methods in enzymology " vol. XI, p. 197-199.
 Enzyme structure.
 édité par C. H. W. HIRS, Academic Press, New York
 et Londres.
- HNILICA L. S. et JOHNSON A. W. (1970) 26, 27
 Fractionation and analysis of nuclear proteins in
 sea urchin embryos
Exptl. Cell Res., 63, 261-270.
- HOOPER J. A. et SMITH E. L., SOMMER K. R. et CHALKLEY 121
 R. (1973)
 Histone III. IV- Aminoacid sequence of histone III
 of the testes of the Carp, *Letiobus bubalus*
J. Biol. Chem., 248, 3275-3279.
- INGLES C. J. et DIXON G. H. (1967) 38
 Phosphorylation of protamine during spermatogene-
 sis in trout testis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 1011-1018.
- IWAI K., ISHIKAWA K. et HAYASHI H. (1970) 4, 73
 Aminoacid sequence of slightly lysine-rich histone
Nature, 226, 1056-1058.
- JOHNS E. W., PHILLIPS D. M. P., SIMSON P. et BUTLER 40
 J. A. V. (1960)
 Improved fractionation of arginine-rich histones
 from calf thymus
Biochem. J., 77, 631-636.

- 207
- JOHNS E. W. (1964) 32
 Studies on histones . 7- Preparative methods for
 histone fractions from calf thymus
Biochem. J., 92, 55-59.
- JOHNS E. W. (1967) 49, 95
 A method for the selective extraction of histone
 fractions F2a1 and F2a2 from calf thymus
 deoxyribonucleoprotein at pH 7,0.
Biochem. J., 105, 611-614.
- JOHNS E. W., GOODWIN G. H., WALKER J. M. et
 SANDERS C. (1975) 2, 3
 Chromosomal proteins related to histones
 in " The structure and function of Chromatin "
Ciba Foundation Symposium, 28, 95-107.
- JOHNSON A. W., WILHELM J. A. et HNILICA L. S. (1973a) 29
 Nuclear basic protein acetylation during early
 sea urchin development
Biochim. Biophys. Acta, 295, 150-158.
- JOHNSON A. W., WILHELM J. A., WARD D. N. et HNILICA L. S. 30
 (1973b)
 The composition of sea urchin sperm and embryo
 histones
Biochim. Biophys. Acta, 295, 140-149.
- JONES G. M. T., RALL S. C. et COLE R. D. (1974) 42
 Extension of the aminoacid sequence of a lysine-
 rich histone
J. Biol. Chem., 249, 2548-2553.
- KALTSCHMIDT E. et WITTMANN H. G. (1970) 55
 Ribosomal proteins. VII- Two dimensional polyacry-
 lamide gel electrophoresis for fingerprinting of
 ribosomal proteins
Anal. Biochem., 36, 401-412.
- KEDES L. H., GROSS P. R., COGNETTI G. et HUNTER A. L. 27
 (1969)
 Synthesis of nuclear and chromosomal proteins on
 light polyribosomes during cleavage in the sea
 urchin embryo
J. Mol. Biol., 45, 337-351.
- KELLEY R. I. (1973) 12
 Isolation of a histone II b1- II b2 complex
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1588-1594.

- KINKADE J. M. Jr et COLE R. D. (1966) 71
 A structural comparison of different lysine-rich
 histones of calf thymus
J. Biol. Chem., 241, 5798-5805.
- KMIECIK D. (1976) 115
 Contribution à la détermination de la structure
 primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet
 (Etude des peptides tryptiques de la protéine
 native et maléylée).
Thèse de Doctorat de 3ème cycle en Biochimie, Lille.
- KOOTSTRA A. et BAILEY G. S. (1976) 7, 199
 The primary structure of histone H2B from rainbow
 trout (*Salmo trutta*) testes
FEBS Letters, 68, 76-78.
- KORNBERG R. D. et THOMAS J. O. (1974) 12
 Chromatin structure : oligomers of the histones
Science, 184, 865-868.
- KORNBERG R. D. (1974) 13
 Chromatin structure : a repeating unit of histones
 and DNA
Science, 184, 868-871.
- LAINE B. (1974) 53
 La structure primaire de l'histone riche en alanine,
 leucine et lysine de chloroleucémie du Rat
 (ALK-histone)
Thèse de Doctorat de 3ème cycle en Biochimie, Lille.
- LAINE B., SAUTIERE P. et BISERTE G. (1976) 7, 8
 Primary structure and Microheterogeneities of Rat
 Chloroleukemia histone H2A (histone ALK, II b1 or
 F2a2)
Biochemistry, 15, 1640-1645.
- LANGMORE J. P. et WOOLEY J. C. (1975) 16
 Chromatin architecture : investigation of a subunit
 of chromatin by dark field electron microscopy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2691-2695.
- LEVY S., SIMPSON R. T. et SOBER H. A. (1972) 2
 Fractionation of chromatin components
Biochemistry, 11, 1547-1554.
- LEWIS P. N., BRADBURY E. M. et CRANE ROBINSON C. (1975) 11, 121
 Ionic strength induced structure in histone H4 and
 its fragments 123
Biochemistry, 14, 3391-3400.

- 209
- LIU T. Y., STEIN W. H., MOORE S. et ELLIOTT S. D. (1965) 86
 The sequence of aminoacid residues around the sul-
 fhydryl group at the active site of a streptococcal
 proteinase
J. Biol. Chem., 240, 1143-1149.
- LUCK J. M., RASMUSSEN P. S., SATAKE K. et TSVETIKOV A. N. 49
 (1958)
 Further studies on the fractionation of calf thymus
 histones
J. Biol. Chem., 233, 1407-1414.
- MACGILLIVRAY A. J., CAMERON R. J., KRAUSE D., RICKWOOD 2
 D. et PAUL J. (1972)
 The non histone proteins of chromatin. Their isolation
 and composition in a number of tissues
Biochim. Biophys. Acta, 277, 384-402.
- MARTINSON H. G., SHETLAR M. D. et MCCARTHY B. J. (1976) 200
 Histone-histone interactions within chromatin. Cross-
 linking studies using Ultraviolet light
Biochemistry, 15, 2002-2007.
- MARZLUFF W. F. Jr, SANDERS L. A., MILLER D. M. et MCCARTHY 8, 196
 K. S. (1972)
 Two chemically and metabolically distinct forms of
 calf thymus histone F3
J. Biol. Chem., 247, 2026-2033.
- MURAMATSU M., SMETANA K. et BUSCH H. (1963) 46
 Quantitative aspects of isolation of nucleoli of
 the Walker carcinoma and liver of the Rat
Cancer Research, 23, 510-518.
- NOLL M. (1974) 16
 Subunit structure of chromatin
Nature, 251, 249-251.
- NOLL M., THOMAS J. O. et KORNBERG R. D. (1975) 17
 Preparation of native chromatin and damage caused
 by steering
Science, 187, 1203-1206.
- OGAWA Y., QUAGLIAROTTI G., JORDAN J., TAYLOR C. W., 4, 80
 STARBUCK W. C. et BUSCH H. (1969)
 Structural analysis of the glycine-rich, arginine-
 rich histone. III- Sequence of the amino-terminal
 half of the molecule containing the modified lysine
 residues and the total sequence
J. Biol. Chem., 244, 4387-4392.

	210
OLINS A. L. et OLINS D. E. (1973) Spheroid chromatin units (v bodies) <u>J. Cell Biol.</u> , <u>59</u> , 252-a	16
OLINS A. L. et OLINS D. E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies) <u>Science</u> (Wash D. C.), <u>183</u> , 330-332.	16
OLIVER D. et CHALKLEY R. (1972) An electrophoretic analysis of Drosophila histones. II- Comparison of larval and adult histone patterns in two species of Drosophila. <u>Exptl. Cell Res.</u> , <u>73</u> , 303-310.	25
OLIVER D., SOMMER K. R., PANYIM S., SPIKER S. et CHALKLEY R. (1972) A modified procedure for fractionating histones <u>Biochem. J.</u> , <u>129</u> , 349-353.	25, 49
ORRICK L. R., OLSON M. O. J. et BUSCH H. (1973) Comparison of nucleolar proteins of Normal Rat Liver and Novikoff Hepatoma Ascites cells by two- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> , <u>70</u> , 1316-1320.	2
OUDET P., GROSS-BELLARD M. et CHAMBON P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit <u>Cell</u> , <u>4</u> , 281-300.	17
PALAU J., RUIZ-CARILLO A. et SUBIRANA J. A. (1969) Histones from sperm of the sea urchin <i>Arbacia lixula</i> <u>Eur. J. Biochem.</u> , <u>7</u> , 209-213.	33, 35
PANYIM S. et CHALKLEY R. (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones <u>Arch. Biochem. Biophys.</u> , <u>130</u> , 337-346.	28, 67
PANYIM S., BILEK D. et CHALKLEY R. (1971) An electrophoretic comparison of Vertebrate histones <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>246</u> , 4206-4215.	9, 42, 194
PAOLETTI R. A. et HUANG R. C. C. (1969) Characterization of Sea Urchin Sperm Chromatin and its basic proteins <u>Biochemistry</u> , <u>8</u> , 1615-1624.	33, 35, 36, 70

- PARDON J. F. et WILKINS M. H. F. (1972) 13
A super-coil model for nucleohistones
J. Mol. Biol., 68, 115-124.
- PARTRIDGE S. M. et DAVIES H. F. (1950) 86
Preferential release of aspartic acid during
hydrolysis of proteins
Nature, 165, 62-63.
- PATTHY L. et SMITH E. L.; JOHNSON J. (1973) 7, 8, 121,
196
Histone III. V- The aminoacid sequence of pea
embryo histone III.
J. Biol. Chem., 248, 6834-6840.
- PHELAN J. J., SUBIRANA J. A. et COLE R. D. (1972) 37
An unusual group of lysine-rich histones from
gonads of a sea cucumber *Holothuria tubulosa*
Eur. J. Biochem., 31, 63-68.
- PHELAN J. J., COLOM J., COZCOLLUELA C., SUBIRANA J. A. 32
et COLE R. D. (1974)
A lysine-rich protein from spermatozoa of the
mollusc *Mytilus edulis*
J. Biol. Chem., 249, 1099-1102.
- PHILLIPS D. M. P. et JOHNS E. W. (1959) 49
The chromatography of thymus histones and the
demonstration of proteinase activity in the
unfractionated preparations
Biochem. J., 71, 17P.
- RALL S. C. et COLE R. D. (1971) 42
Aminoacid sequence and sequence variability of
the amino-terminal regions of lysine-rich histones
J. Biol. Chem., 246, 7175-7190.
- RASMUSSEN P. S., MURRAY K. et LUCK J. M. (1962) 49
On the complexity of calf thymus histones
Biochemistry, 1, 79-89.
- RICHARDS B. M. et PARDON J. F. (1970) 13
The molecular structure of nucleohistone (DNH)
Exptl. Cell Res., 62, 184-196.
- ROARK D. E., GEOGHEGAN T. E. et KELLER G. H. (1974) 12
A two subunit histone complex from calf thymus
Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 542-547.

- 212
- ROSEAU G. et PANTEL P. (1969) 89
 Révélation colorée des spots de phénylthiohydantoins
 d'acides aminés
J. Chromatog., 44, 392-395.
- ROUVIERE-YANIV J. et GROS F. (1975) 4
 Characterization of a novel low molecular weight
 DNA-binding protein from Escherichia Coli
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3428-3432.
- SAHASRABUDDHE C. G. et VAN HOLDE K. E. (1974) 16, 17
 The effects of trypsin on nuclease-resistant
 chromatin fragments
J. Biol. Chem., 249, 152-156.
- SAUTIERE P. (1959) 49
 Contribution à l'étude des histones des tissus
 normaux et néoplasiques. Fractionnement chroma-
 tographique et électrophorétique. Composition
 en acides aminés
Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lille.
- SAUTIERE P., MOSCHETTO Y., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. 97
 (1970)
 Structural analysis of the glycine-rich, arginine-
 rich histone from calf thymus : the tryptic peptides
Eur. J. Biochem., 12, 222-226.
- SAUTIERE P., BREYNAERT M. D., MOSCHETTO Y. et BISERTE 80
 G. (1970)
 Séquence complète des acides aminés de l'histone
 riche en glycine et en arginine du thymus de Porc
C. R. Acad. Sci. Paris, 271, 364-365.
- SAUTIERE P., LAMBELIN-BREYNAERT M. D., MOSCHETTO Y. et 80, 194
 BISERTE G. (1971a)
 Histone riche en glycine et en arginine du thymus
 de Porc : étude des peptides tryptiques et séquen-
 ce complète
Biochimie, 53, 711-715.
- SAUTIERE P., TYROU D., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. (1971b) 46, 80
 Structure primaire de l'histone riche en glycine et 194
 en arginine isolée de la tumeur de chloroleucémie
 du Rat
Biochimie, 53, 479-483.

- SAUTIERE P., TYROU D., LAINE B., MIZON J., LAMBELIN-BREYNAERT M. D., RUFFIN P. et BISERTE G. (1972) 4, 125
 Structure primaire de l'histone riche en arginine et en lysine du thymus de Veau
C. R. Acad. Sci. Paris, 274, 1422-1425.
- SAUTIERE P. (1973) 53, 95, 125
 Détermination de la structure primaire d'histones riches en arginine
Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Lille.
- SAUTIERE P., TYROU D., LAINE B., MIZON J., RUFFIN P. et BISERTE G. (1974) 4, 76, 115, 125, 145, 178, 186
 Covalent structure of Calf Thymus ALK-histone
Eur. J. Biochem., 41, 563-576.
- SAUTIERE P., KMIECIK D., LOY O., BRIAND G. et BISERTE G.; GAREL A. et CHAMPAGNE M. (1975) 42
 Chicken erythrocyte histone H5. II- Aminoacid sequence adjacent to the phenylalanine residue
FEBS Letters, 50, 200-203.
- SAUTIERE P., BRIAND G., KMIECIK D., LOY O. et BISERTE G.; GAREL A. et CHAMPAGNE M. (1976) 5
 Chicken erythrocyte histone H5. III- Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues)
FEBS Letters, 63, 164-166.
- SCHROËDER W. A., SHELTON J. R., SHELTON J. B., CORMICK J. et JONES R. T. (1963) 87
 The aminoacid sequence of the γ chain of human foetal hemoglobin
Biochemistry, 2, 992-1008.
- SCHÜLTZ J., ALLISON H. et GRICE M. (1962) 86
 Specificity of the cleavage of proteins by dilute acid. I- Release of aspartic acid from insulin, ribonuclease and glucagon
Biochemistry, 1, 694-698.
- SEARCY D. G. (1975) 4
 Histone-like protein in the Prokaryote *Thermoplasma acidophilum*
Biochim. Biophys. Acta, 395, 535-547.
- SENSHU T. (1971) 34
 Fractionation of histones from chicken erythrocyte and sea urchin sperm by CM-cellulose chromatography with ethanolic formic acid
Biochim. Biophys. Acta, 243, 323-331.

- SHAW L. M. et SEAMONDS B. (1972) 36
 Characterization of chromatin prepared from the
 erythrocytes of the common bloodworm *Glycera*
dibranchiata
Life Sciences, 11, 259-266.
- SHEROD D., JOHNSON G. et CHALKLEY R. (1974) 9
 Studies on the heterogeneity of lysine-rich his-
 tones in dividing cells
J. Biol. Chem., 249, 3923-3931.
- SKANDRANI E., MIZON J., SAUTIERE P. et BISERTE G. (1972) 12
 Etude de la fraction F2b des histones de thymus de
 Veau
Biochimie, 54, 1267-1272.
- SMERDON M. J. et ISENBERG I. (1973) 121
 The effect of temperature on histone GRK aggregation
Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 1029-1034.
- STEELE W. J. et BUSCH H. (1963) 47
 Studies on acidic nuclear proteins of the Walker
 tumor and liver
Cancer Research, 23, 1153-1163.
- STEHELIN D. et DURANTON H. (1969) 88
 Dérivés dansylés des acides aminés. Chromatographie
 monodimensionnelle et simultanée de plusieurs
 échantillons sur une même couche mince
J. Chromatog., 43, 93-102.
- STRICKLAND M., STRICKLAND W. N., BRANDT W. F. et VON 38, 46,
 HOLT C. (1974a) 77, 122
 Sequence of the cysteine-containing portion of
 histone F2a1 from the sea urchin *Parechinus*
angulosus
FEBS Letters, 40, 346-348.
- STRICKLAND W. N., STRICKLAND M., BRANDT W. F., MORGAN 7, 36, 39,
 M. et VON HOLT C. (1974b) 40, 41, 69,
 73, 74
 Partial aminoacid sequence of two new arginine,
 serine-rich histones from male gonads of the sea
 urchin *Parechinus angulosus*
FEBS Letters, 40, 161-166.
- STRICKLAND W. N., SCHALLER H., STRICKLAND M. et VON 42
 HOLT C. (1976)
 Partial aminoacid sequence of histone H1 from sperm
 of the sea urchin *Parechinus angulosus*
FEBS Letters, 66, 322-327.

- SUBIRANA J. A. et PALAU J. (1968) 33
 Histone-like proteins from the sperm of Echinoderms
Exptl. Cell Res., 53, 471-477.
- SUBIRANA J. A. (1970) 36, 72
 Nuclear proteins from a somatic and a germinal
 tissue of Echinoderm *Holothuria tubulosa*
Exptl. Cell Res., 63, 253-260.
- SUBIRANA J. A., PALAU J., COZCOLLUELA C. et RUIZ-CARILLO
 A. (1970) 9, 30,
 34
 Very lysine-rich histone of Echinoderms and Molluscs
Nature, 228, 992-993.
- SUBIRANA J. A. (1971) 77
 Specific aggregation products of histone fractions
 (presence of cysteine in F2a1 from Echinoderms).
FEBS Letters, 16, 133-136.
- SUBIRANA J. A. et UNZETA M. (1972) 37
 Phosphorylation of histone-like components during
 spermiogenesis in the sea urchin
FEBS Letters, 28, 112-114.
- SUBIRANA J. A., COZCOLLUELA C., PALAU J. et UNZETA M.
 (1973) 31, 32
 Protamines and other basic proteins from spermato-
 zoa of molluscs
Biochim. Biophys. Acta, 317, 364-379.
- SUNG M. T. et DIXON G. H. (1970) 171
 Modification of histones during spermiogenesis
 in trout : A molecular mechanism for altering
 histone-binding to DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 1616-1623.
- THOMAS J. O. et KORNBERG R. D. (1975) 14, 15
 An octamer of histones in chromatin and free in
 solution
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2626-2630.
- TSUNG C. M. et FRAENKEL-CONRAT H. (1965) 87
 Preferential release of aspartic acid by dilute acid
 treatment of tryptic peptides
Biochemistry, 4, 793-801.
- VAN DER WESTHUYZEN D. R. et VON HOLT C. (1971) 12
 A new procedure for the isolation and fractionation
 of histones
FEBS Letters, 14, 333-337.

- VANHOUTTE-DURAND G. (1975) 72, 73, 77
 Les histones de gonade d'Etoile de Mer, *Asterias rubens* L. - Isolement et caractérisation
Thèse de Doctorat d'Etat de Pharmacie, Lille.
- VIDALI G., GERSHEY E. L. et ALLFREY V. G. (1968) 28
 Chemical studies of histone acetylation.
 The distribution of ϵ -N-acetyl lysine in calf thymus histones
J. Biol. Chem., 243, 6361-6366.
- VOROBYEV V. I., GINEITIS A. A. et VINOGRADOVA I. A. (1969) 26
 Histones in early embryogenesis
Exptl. Cell Res., 57, 1-7.
- WALKER J. M., GOODWIN G. H. et JOHNS E. W. (1976) 3
 The similarity between the primary structure of two Non Histone Chromosomal Protein
Eur. J. Biochem., 62, 461-469.
- WILSON R. K., STARBUCK W. C., TAYLOR C. W., JORDAN J. et BUSCH H. (1970) 80, 194
 Structure of the glycine-rich, arginine-rich histone of the Novikoff hepatoma
Cancer Research, 30, 2942-2951.
- WOODCOCK C. L. F. (1973) 16
 Ultrastructure of inactive chromatin
J. Cell Biol., 59, 368-a
- WOODCOCK C. L. F., SWEETMAN H. E. et FRADO L. L. (1976) 17
 Structural repeating units in chromatin.
 II- Their isolation and partial characterization
Exptl. Cell Res., 97, 111-119.
- YAMADA S. et ITANO M. A. (1966) 86, 89
 Phenanthrene quinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines
Biochim. Biophys. Acta, 130, 538-540.
- YEOMAN L. C., OLSON M. O. J., SUGANO N., JORDAN J. J., TAYLOR C. W., STARBUCK W. C. et BUSCH H. (1972) 4, 125
 Aminoacid sequence of the center of the arginine-lysine-rich histone from calf thymus.
 The total sequence
J. Biol. Chem., 247, 6018-6023.

YEOMAN L. C., TAYLOR C. W. et BUSCH H. (1973)

2

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
of acid-extractable nuclear proteins of normal rat
liver and Novikoff hepatoma ascites cells
Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 956-966.

