

50376
1977
84

Numéro d'Ordre

50376
1977
84

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR-INGÉNIEUR

par

Arlette MARTINAGE

HISTONE H 2 B DU RAT : STRUCTURE PRIMAIRE SITES DE PHOSPHORYLATION IN VITRO



Membres du Jury : Monsieur J. MONTREUIL, Président
Monsieur G. MARCHIS-MOUREN, Rapporteur
Monsieur G. BISERTE
Monsieur J. KREMBEL
Monsieur P. SAUTIERE

Présentée le 18 Octobre 1977

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
Mle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTTEL 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.	BKOUCHE 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.	DÉ 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	EVARD 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.	MACKE 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

Ce travail a été réalisé dans les Laboratoires
de l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules
Normales et Cancéreuses (U. 124 I.N.S.E.R.M.) 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.

A ma mère,

A la mémoire de mon père,

A ma famille,

A mes amis,

Que tous ceux qui m'ont aidée et encouragée
dans la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma profonde
reconnaissance.

Ce travail a bénéficié de l'aide de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrat 74.5.059.2).

Il a fait l'objet de la publication et des présentations suivantes :

Publication :

Purification by preparative electrophoresis and Characterization of histone H 2 B from Rat Chloroleukaemia

A. MARTINAGE, P. SAUTIERE, J.P. KERCKAERT et G. BISERTE
Biochim. Biophys. Acta, 420, 37-41 (1976)

Présentations :

Histone H 2 B de Veau (Thymus, Pancréas), de Rat (Thymus, Chloroleucémie), d'Oursin (gonade) (Comportement électrophorétique et composition en acides aminés)

A. MARTINAGE, A. LIPINSKA, D. WOUTERS, P. SAUTIERE et G. BISERTE

Journées franco-belges de Biochimie, Lille, 24-26 juin 1976.

Sera présentée en août 1977 au 12ème Congrès de la F.E.B.S., à Copenhague

Studies on the Phosphorylation of Rat Thymus H 2 B Histone by the Cyclic A M P Dependent Protein Kinase from Rat Pancreas.

P. MANGEAT, A. MARTINAGE, H. CHAHINIAN, P. SAUTIERE et G. MARCHIS-MOUREN.

Dans le thymus de Veau, deux formes d'histone H 2 A, possédant toutes deux un résidu de thréonine en position 16, ont été identifiées, l'une avec un résidu de lysine en position 99 et l'autre, avec un résidu d'arginine en position 99 (SAUTIERE et coll., 1974).

Les résultats acquis dans notre laboratoire sur l'histone H 2 A de chloroleucémie du Rat nous ont donc incitée à rechercher d'éventuelles modifications structurales au niveau de l'histone H 2 B isolée de ce tissu tumoral et de l'histone H 2 B isolée du thymus de Rat, le thymus étant considéré comme le tissu sain de référence le plus approprié pour nos études comparatives.

Nous avons pu ainsi établir une totale identité de structure primaire de l'histone H 2 B de Rat (Chloroleucémie et thymus) avec celle de l'histone H 2 B de thymus de Veau et confirmer les travaux d'IWAI et de son groupe (IWAI et coll., 1970).

Ces études structurales ont constitué en outre, une étape préliminaire indispensable au cours de laquelle fut mise au point la méthodologie qui allait ensuite nous permettre de déterminer les sites de phosphorylation in vitro de l'histone H 2 B de thymus de Rat.

La phosphorylation de cette histone a été réalisée en présence d'A T³²P par le Professeur MARCHIS-MOUREN et ses collaborateurs (Université d'Aix-Marseille) à l'aide d'une kinase du pancréas de Rat isolée par leurs soins.

Ce travail s'inscrit dans le cadre général des recherches du groupe "Histones" de l'Unité 124 I.N.S.E.R.M. de Lille dont l'orientation majeure est l'étude des variations de la structure primaire des histones au cours de l'évolution des espèces.

Les études structurales que nous avons réalisées sur l'histone H 2 B de Chloroleucémie du Rat, ont été précédées de la détermination de la structure primaire des histones H 4 et H 2 A isolées de ce même tissu.

La structure primaire de l'histone H 4 d'origine tumorale (SAUTIERE et coll., 1971) est identique à celle de l'histone H 4 de thymus de Veau. Aucune différence dans le taux d'acétylation et de méthylation n'a pu être notée.

Dans l'histone H 2 A de Chloroleucémie du Rat, on rencontre un certain polymorphisme qui se traduit par la présence de 3 histones H 2 A (LAINE et coll., 1976) :

- L'histone H 2 A- α qui représente 60 p. cent des molécules d'histone H 2 A, possède un résidu de sérine en position 16 et un résidu de lysine en position 99.

- L'histone H 2 A - β 1 qui représente 20 p. cent des molécules d'histone H 2 A, possède un résidu de thréonine en position 16 et un résidu d'arginine en position 99.

- L'histone H 2 A - β 2 qui représente 20 p. cent des molécules d'histone H 2 A, possède un résidu de sérine en position 16 et un résidu d'arginine en position 99.

Un polymorphisme est également observé dans l'histone H 2 A de thymus de Rat où la forme H 2 A - α intervient pour 33 p. 100 des molécules et la forme H 2 A - β 1 pour 66 p. 100 des molécules (LAINE et coll., manuscrit en préparation).

INTRODUCTION

1

La Chromatine est un complexe D.N.A. protéines dans le noyau cellulaire des Eucaryotes. De faibles quantités de R.N.A. y sont également associées.

Les protéines nucléaires sont réparties essentiellement en 2 groupes :

- les histones, protéines basiques qui représentent la plus grande partie des protéines nucléaires.
- les protéines non-histones (N.H.P.), par opposition aux précédentes, qui forment un groupe beaucoup plus hétérogène comprenant des protéines à caractère acide et aussi des enzymes nucléaires.

Alors que le rapport histone / D.N.A. est généralement voisin de 1, quelle que soit l'espèce animale ou végétale considérée, le rapport protéines non-histones / D.N.A. est plus variable (0,5 à 1,5)

Au sein de la Chromatine, de nombreuses interactions ont lieu entre les protéines et le D.N.A. (interactions histone - D.N.A. ; interactions N.H.P. - D.N.A.) ou (et) entre les protéines elles-mêmes (interactions histone-N.H.P. ; interactions histone - histone).

Ces interactions sont essentielles à l'organisation et à la fonction de la chromatine.

A) LES HISTONES

Les histones constituent une famille de protéines basiques associées au D.N.A. dans les cellules somatiques des Eucaryotes.

Cinq types d'histones sont normalement présents dans la chromatine. Toutefois la chromatine isolée d'erythrocytes nucléés en renferme six.

L'association de ces protéines avec le D.N.A. est le fait de multiples liaisons ioniques entre les groupements phosphates du D.N.A., chargés négativement et les groupements aminés basiques de la lysine et de l'arginine chargés positivement.

Ces protéines dont la séquence en acides aminés a très peu varié au cours de l'évolution des espèces, sont parmi celles qui subissent le plus de modifications chimiques après leur synthèse. Ces modifications comprennent : l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation.

Les conséquences de ces modifications ne sont pas encore exactement connues mais l'acétylation et la phosphorylation en diminuant la basicité des histones, influencent la structure de ces protéines et par là même, la structure de la chromatine (DE LANGE et SMITH, 1975). La structure qui résulterait de ces modifications pourrait être reliée à une activité particulière de la chromatine.

1) Caractérisation chimique

En fonction de leurs compositions en acides aminés les histones sont réparties en 3 classes :

a) les histones très riches en lysine :

- l'histone H 1 : c'est l'histone la plus variable, à la fois

par le nombre de ses sous-fractions dans un tissu donné et par les différences qu'elle présente dans sa structure au cours de l'évolution. ELGIN et WEINTRAUB (1975) ont noté 15 p. cent de substitutions parmi les sous-fractions d'un organisme donné.

Outre son hétérogénéité, l'histone H 1 se distingue par le caractère fortement basique de sa moitié C-terminale alors que dans les autres histones, il y a nette prédominance des résidus basiques dans la moitié N-terminale.

- l'histone H 5 : cette histone, spécifique des réticulocytes et des érythrocytes nucléés rencontrés chez les Oiseaux, les Reptiles, les Batraciens et les Poissons, est synthétisée durant la maturation des globules rouges où elle remplace progressivement et partiellement l'histone H 1. Elle se distingue de l'histone H 1 par son taux élevé d'arginine.

b) l'histone riche en lysine : H 2 B

Cette histone peu évolutive est capable d'interagir avec les histones H 2 A et H 4.

Elle est caractérisée par sa richesse en sérine.

c) les histones riches en arginine : H 2 A, H 3 et H 4

Les histones H 3 et H 4 sont parmi les protéines les moins évolutives.

L'histone H 3 est la seule histone renfermant de la cystéine.

Cependant, chez les Echinodermes, l'histone H 4 en renferme également.

Les histones sont caractérisées par leur faible poids moléculaire (11.000 à 22.000 daltons), leur richesse en acides aminés basiques et aussi, il faut le noter, à l'exception de l'histone H 1, leur richesse en acides aminés hydrophobes (x) dont le nombre est égal ou supérieur à celui des acides aminés basiques.

Le tableau I résume les principales caractéristiques des histones H 1, H 5, H 2 B, H 2 A, H 3 et H 4.

2) Structure primaire

Nous connaissons actuellement la séquence complète en acides aminés de 4 histones isolées du thymus de Veau : H 4 (DE LANGE et coll., 1969 - a ; OGAWA et coll., 1969) ; H 2 B (HNILICA et coll., 1970 ; Iwai et coll., 1970) ; H 3 (DE LANGE et coll., 1972) ; H 2 A (SAUTIERE et coll., 1972 ; YEOMAN et coll., 1972).

La structure primaire de l'histone H 1 isolée du thymus de Lapin a récemment été déterminée par COLE (Communication personnelle).

La séquence en acides aminés de l'histone H 5, spécifique des erythrocytes nucléés, est actuellement en cours de détermination dans notre laboratoire (SAUTIERE et coll., 1976).

De nombreuses études ont été entreprises ces dernières années pour rechercher une certaine variabilité des histones à travers l'évolution des espèces.

(x) Les acides aminés hydrophobes comprennent : leucine, isoleucine, valine, methionine, proline et phenylalanine.

TABEAU I

Caractérisation des histones

Classe	Histone	Rapport Lys/Arg	nombre de résidus	P.M.	N-Terminal	C-terminal
Très riches en lysine	H 1	22.0	≈ 215	≈ 21.500	Ac - Ser	Lys
	H 5	2.0	185	20.300	Thr Partiellement acétylée	Lys
Riche en lysine	H 2 B	2.50	125	13.774	Pro	Lys
Riches en arginine	H 2 A	1.17	129	14.004	Ac - Ser	Lys
	H 3	0.72	135	15.324	Ala	Ala
	H 4	0.79	102	11.282	Ac - Ser	Gly



La première histone dont la séquence fut déterminée est l'histone H 4 (DELANGÉ et coll., 1969-b) isolée de thymus de Veau. Très rapidement, des études comparatives ont été entreprises sur cette histone isolée de différentes espèces végétales ou animales (Pois : DELANGÉ et coll., 1969-b ; Porc : SAUTIERE et coll., 1970b ; Oursin : WOUTERS-TYROU et coll., 1976).

Entre l'histone H 4 isolée du thymus de Veau et du Pois, il n'apparaît que deux mutations conservatives. Par contre, l'histone H 4 d'Oursin est caractérisée par la présence d'un résidu de cystéine, jusqu'alors trouvée uniquement dans l'histone H 3.

Des études similaires ont été réalisées sur différents tissus cancéreux : cellules leucémiques humaines (DESAI et FOLEY, 1970), hépatome de Novikoff (WILSON et coll., 1970), chloroleucémie du Rat (SAUTIERE et coll., 1971), tumeur au benzopyrene du Rat (MARTINAGE, résultats non publiés).

L'histone H 2 A a également été l'objet d'études comparatives de structure (thymus de Veau : SAUTIERE et coll., 1972 ; testicule de Truite : BAILEY et DIXON, 1973 ; chloroleucémie du Rat : LAINE et coll., 1976 ; érythrocyte de Poulet : LAINE, non publié ; thymus de Rat : LAINE, non publié ; gonades d'Oursin : WOUTERS-TYROU, 1977).

Il ressort de ces études une certaine variabilité dans la structure primaire de l'histone H 2 A. La plupart des changements observés sont, cependant, de caractère conservatif et sont localisés en dehors des séquences hydrophobes de la molécule (séquences 43 - 70 et 100 - 117).

Un certain polymorphisme a pu être observé dans l'histone H 2 A isolée du thymus (Veau, Rat) et de la chloroleucémie du Rat. Ce caractère a également été retrouvé dans les histones H 3 et H 5.

Par rapport aux autres histones, l'histone H 2 B n'a pas fait l'objet d'études intensives de structure comparée. Ce fait est sans doute lié aux difficultés de préparer cette histone à l'état pur.

Sa structure primaire a cependant été déterminée chez la Truite (*Salmo Trutta*) par KOOTSTRA et BAILEY (1976) et chez l'Oursin (*Parechinus angulosus*) par STRICKLAND et coll., (communication personnelle).

La structure primaire de l'histone H 2 B présente un taux de variabilité durant l'évolution, analogue à celui de la structure primaire de l'histone H 2 A. Comme dans l'histone H 2 A, les changements interviennent surtout dans la partie N-terminale de la protéine et en dehors de la zone hydrophobe de la protéine.

La comparaison des structures primaires des différentes classes d'histones fait apparaître l'irrégularité dans la distribution des résidus basiques et des résidus hydrophobes.

Il ressort de ces travaux que les histones ont subi peu de transformations au cours de l'évolution des espèces. Deux d'entre elles - les histones H 3 et H 4 - sont hautement conservatives. De plus, il semble que la cancérisation ne modifie pas leur structure : ceci a été observé dans le cas des histones H 2 A, H 2 B et H 4.

3) Modifications chimiques des histones

Les protéines chromosomales et particulièrement les histones, sont l'objet, après leur synthèse, de nombreuses modifications chimiques telles que l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation.

Ces modifications sont spécifiques de certaines phases du cycle cellulaire : la phosphorylation de l'histone H 1 en est un exemple typique et particulièrement bien étudié ; elle est importante au cours de la phase S,

phase de synthèse des histones et du D.N.A. De plus, cette histone est "super-phosphorylée" au moment de la condensation des chromosomes juste avant la mitose.

Les modifications chimiques des histones sont également spécifiques de certains sites basiques dans la séquence des histones.

Réversibles pour la plupart, elles altèrent de façon importante les interactions histone-D.N.A. et pourraient avoir ainsi une influence considérable :

- dans l'organisation de la chromatine pour la transcription du D.N.A. (l'acétylation).
- dans les changements de conformation de la chromatine et de la structure du chromosome (la phosphorylation).

a) l'acétylation

2 types d'acétylation sont trouvés dans les histones :

- l'acétylation de l'extrémité N-terminale de la protéine
- l'acétylation intrachaîne du groupement ϵ -NH₂ de la lysine.

L'acétylation de l'extrémité N-terminale de la protéine est une modification étroitement associée à la synthèse de la chaîne polypeptidique et apparemment irréversible. Le résidu de sérine N-terminal est acétylé dans les histones H 1, H 2 A et H 4.

L'acétylation des groupements ϵ -NH₂ de la lysine est au contraire post-synthétique et localisée dans le noyau. C'est une modification réversible. Les sites d'acétylation interne sont spécifiques : les histones H 3 et H 4 ont le degré d'acétylation le plus élevé. L'histone H 1, bien que très riche en lysine, ne possède pas de groupement acétyl intra-chaîne.

Les sites d'acétylation interne ont été identifiés par les études de séquence peptidique.

L'histone H 3 de thymus de Veau est acétylée sur les résidus de lysine en positions 14 et 23 (DE LANGE et coll., 1973).

L'histone H 3 de testicule de Truite est acétylée sur les résidus de lysine en positions : 9, 14, 18 et 23 (CANDIDO et DIXON ; 1972 - b).

L'histone H 4 de thymus de Veau possède un résidu de lysine en position 16 acétylé à 50 p. 100. Il représente le site majeur d'acétylation de cette histone.

Cette acétylation se traduit par la présence de 2 bandes électrophorétiques d'égale intensité en gel de polyacrylamide à pH 2,7 et en milieu urée 2,5 M. La bande la plus rapide correspond à la forme non-acétylée et l'autre, à la forme mono-acétylée.

Une troisième bande de faible intensité et de migration plus lente que les précédentes, correspond vraisemblablement à une forme diacétylée de l'histone H 4.

Le second site d'acétylation de cette histone pourrait se situer au niveau des résidus de lysine en position 5, 8 ou 12.

Du reste, dans l'histone H 4 de Pois, DE LANGE et coll., 1969 - b) ont mis en évidence 2 sites d'acétylation, l'un majeur en position 16, l'autre en position 8.

Ces sites d'acétylation sont spécifiques et leur nombre varie avec le tissu considéré : ainsi l'histone H 4 de Truite possède 4 sites d'acétylation localisés sur les résidus de lysine 5, 8, 12 et 16 (CANDIDO et DIXON, 1972 - a).

Dans l'histone H 2 A de testicule de Truite, un seul site d'acétylation a été identifié sur le résidu de lysine en position 5 (CANDIDO et DIXON, 1972 - a).

Il apparaît que les histones H 2 A et H 4 ont en commun, 1 site d'acétylation (acétyllysine 5). Ceci n'est pas étonnant compte tenu du fait que ces 2 histones ont la même séquence N-terminale.

L'étude des sites d'acétylation des histones de testicule de Truite a conduit DIXON et coll., (1975) à individualiser 2 types d'acétylation (Tableau II).

- Type A : la lysine acétylée est placée entre deux acides aminés à courte chaîne (Glycine, Alanine, Sérine ou Thréonine).

- Type B : la lysine acétylée est adjacente à un résidu basique de lysine ou d'arginine.

Ces deux types d'acétylation pourraient refléter l'existence de 2 acétylases de spécificité différente.

L'acétylation en modifiant la charge des histones peut altérer les interactions histone - D.N.A. En étudiant chacune des sous-fractions d'histones non acétylées, monoacétylées, diacétylées, par dichroïsme circulaire, ADLER et coll., (1974) ont pu montrer que la forme monoacétylée de l'histone H 4 altère moins la conformation du D.N.A. que la forme non-acétylée. Ainsi, l'acétylation en modifiant la structure de la chromatine pourrait jouer un rôle important dans la replication du D.N.A.

b) la phosphorylation

La phosphorylation porte principalement sur le groupement hydroxyle de la sérine et, à un degré moindre, sur le groupement hydroxyle de la thréonine (ORD et STOCKEN, 1966) (KLEINSMITH et coll., 1966).

Comme l'acétylation, la phosphorylation est une modification post-synthétique et réversible.

TABLEAU II

Classification des sites d'acétylation IN VIVO dans les histones de testicule de Truite (CANDIDO et DIXON, 1971 ; CANDIDO et DIXON 1972 - a et 1972 - b)

Histone	Type A	Type B
H4	<p>5 - Gly - Lys (Ac) - Gly -</p> <p>8 - Gly - Lys (Ac) - Gly -</p> <p>12 - Gly - Lys (Ac) - Gly -</p>	<p>16 Ala - Lys (Ac) - Arg</p>
H 2 A	<p>5 - Gly - Lys (Ac) - Thr -</p>	
H 3	<p>14 - Gly - Lys (Ac) - Ala -</p> <p>23 - Thr - Lys (Ac) - Ala -</p>	<p>9 - Arg - Lys (Ac) - Ser</p> <p>18 - Arg - Lys (Ac) - Gln</p>
H 2 B	<p>5 - Ala - Lys (Ac) - Ser -</p> <p>18 - Thr - Lys (Ac) - Ser -</p>	<p>10 - Lys - Lys (Ac) - Gly -</p> <p>13 - Ser - Lys (Ac) - Lys -</p>

C'est une réaction enzymatique faisant intervenir une protéine kinase qui transfère le groupement phosphate en position γ de l'A.T.P. sur un résidu de sérine ou de thréonine.

Dans un second temps, ce groupement phosphate est déplacé de la protéine sous forme de phosphate inorganique par une phosphatase.

Ces deux réactions et particulièrement la phosphorylation à partir de l'A.T.P. consomment beaucoup d'énergie : leur rôle serait peut-être de réguler les fonctions des autres protéines (SEGAL, 1973).

En 1975, ELGIN et WEINTRAUB soulignent la spécificité de la phosphorylation dans le temps (au cours du cycle cellulaire) et la spécificité de lieu (existence de sites privilégiés liés à l'action d'enzymes spécifiques). En aucun cas, toutes les histones ne sont modifiées de la même façon et en même temps.

Les sites de phosphorylation sont liés à la spécificité des protéines kinases. La première protéine kinase fut isolée et caractérisée par LANGAN et SMITH (1967). Toutes les histones sont phosphorylées par cette histone kinase mais les histones riches en lysine se révèlent être le meilleur substrat. L'activité de l'enzyme peut être stimulée 8 à 20 fois par l'A.M.P. cyclique (adenosine - 3', 5' - monophosphate). Par contre, l'histone kinase prédominante dans les cellules en mitose, n'est pas activée par le nucléotide cyclique (LAKE, 1973).

De nombreuses et récentes études sur la phosphorylation lui confère un rôle clé dans la régulation de la croissance cellulaire (BALHORN et coll., 1972 - a ; STEIN et coll., 1974 ; BRADBURY et coll., 1974 ; KRUEH et coll., 1975).

En bloquant les cellules dans la phase G 1 par privation d'un acide aminé essentiel (la lysine), SHEPHERD et coll., (1971) trouvent un turn-over lent des phosphates liés alors qu'un turn-over rapide des phosphates est mis en évidence dans un milieu qui stimule la croissance des cellules.

BALHORN et coll., (1975) ont montré que la phosphorylation était nettement augmentée durant la phase S du cycle cellulaire ainsi que pendant la mitose. Au cours des autres phases du cycle cellulaire, dans les cellules en division rapide, les histones sont phosphorylées mais à un degré moindre.

Par l'étude des enzymes catalysant les réactions, par le nombre de sites de phosphorylation et le taux de phosphorylation in vivo, LANGAN et HOHMANN (1975) ont mis en évidence deux types de phosphorylation de l'histone H 1, l'une dépendant de l'A.M.P. cyclique, l'autre non dépendant. Lorsque les cellules sont au repos, la phosphorylation nécessite la présence d'A.M.P. cyclique ou une stimulation hormonale (glucagon). Cette phosphorylation est limitée à environ 1 p. cent des molécules de l'histone H 1 de foie de Rat.

Par contre, au cours de la croissance des cellules, dans le foie en régénération et les cellules tumorales, la phosphorylation est massive et concerne toutes les molécules d'histones H 1 ; elle n'est pas stimulée par l'A.M.P. cyclique et elle est localisée sur la thréonine comme sur la sérine.

BALHORN et coll., (1972 - b) avaient déjà observé une relation proportionnelle entre le taux de croissance cellulaire et le taux de phosphorylation de l'histone H 1, isolée de différentes tumeurs de Rat et de Souris.

Selon BRADBURY et coll., (1974), la phosphorylation de l'histone H 1 est maximale à la fin de la phase G 2 au moment de la condensation des chromosomes, avant la mitose. Puis, le taux de phosphorylation décroît très rapidement jusqu'à un minimum au moment de la métaphase. Ceci a conduit les auteurs à émettre l'hypothèse que la phosphorylation de l'histone H 1 est l'étape d'initiation de la mitose.

L'histone H 2 B est, après l'histone H 1, un bon substrat pour l'action des protéines kinases in vitro. La détermination des sites de phosphorylation de cette histone a été réalisée avec différentes kinases : kinases de lymphocytes (FARAGO et coll., 1975) ; kinases de Ver à soie (HASHIMOTO et coll., 1975). kinases de cerveau de Porc (SHLYAPNIKOV et coll., 1975)

Un site de phosphorylation, commun jusqu'à présent à toutes les kinases, est la sérine 36.

Les autres sites de phosphorylation de l'histone H 2 B (ser 14, ser 32) sont spécifiques d'une kinase donnée.

L'importance de certains sites de phosphorylation est fonction également de la présence ou de l'absence d'A.M.P. cyclique : FARAGO et coll., (1975) rapportent la présence de 4 sites de phosphorylation, à peu près équivalents, dans l'histone H 2 B phosphorylée par un enzyme indépendant de l'A.M.P. cyclique.

En présence de ce nucléotide cyclique, l'un de ces sites est phosphorylé préférentiellement (sérine 36).

La phosphorylation de l'histone H 2 B comme celle de l'histone H 1 débute juste avant la phase S et pourrait ainsi constituer un mécanisme d'activation pour les synthèses de la phase S (SHEPHERD et coll., 1972).

Des études similaires ont été menées sur l'histone H 2 A : l'histone H 2 A est phosphorylée dès sa synthèse et sa phosphorylation n'est pas spécifique d'une phase du cycle cellulaire ; elle est indépendante de la synthèse du D.N.A.

Un site de phosphorylation a été déterminé par SHLYAPNIKOV et coll., (1975) sur l'histone H 2 A de thymus de Veau, sur la sérine en position 19.

Dans les histones H 2 A et H 4 de testicule de Truite, LOUIE et coll., (1973) ont mis en évidence la phosphorylation de la sérine en position N-terminale de la protéine en isolant le peptide tryptique N-Ac.Ser - Gly - Arg.

Les travaux réalisés sur la phosphorylation des histones H 3 et H 4, sont beaucoup moins nombreux : l'histone H 3, très peu phosphorylée pendant l'interphase, l'est fortement quand les cellules entrent en mitose. (GURLEY et coll., 1974).

Par contre, l'histone H 4 est très peu phosphorylée tout au long du cycle cellulaire. Sa phosphorylation est un processus continu et régulier qui pourrait avoir quelque rôle dans la détermination de la structure des chromosomes dans la cellule (LOUIE et coll., 1973).

De nombreuses formes possibles d'histones modifiées par acétylation et phosphorylation ont été mises en évidence sur l'histone H 4 d'erythroblastes d'Oiseaux par RUIZ-CARRILLO et coll., (1975) (Figure 1). La complexité du métabolisme de l'histone H 4 peut être encore accrue par une autre modification chimique qui suit la synthèse de l'histone et peut modifier ses interactions avec le D.N.A. : la méthylation.

c) la méthylation

La méthylation d'acides aminés dans les histones a été découverte par MURRAY (1964).

La présence d'acides aminés méthylés tels que l' ξ -N - monométhyllysine, ϵ -N - diméthyllysine, ξ -N - triméthyllysine, β -méthylhistidine et ω -N - méthyllarginine a été trouvée dans les hydrolysats d'histones de différents tissus (MURRAY, 1964 ; PAIK et KIM, 1967 ; HEMPEL et coll., 1968 ; GERSHEY et coll., 1969 ; PAIK et KIM, 1970).

Les dérivés méthylés de l'histidine et de l'arginine sont généralement présents à l'état de traces. Seule la lysine ξ -N - méthylée a été identifiée à des positions spécifiques par la détermination de la séquence en acides aminés des histones (DE LANGE et coll., 1969 - a)(DE LANGE et coll., 1973)

La réaction qui a lieu dans le noyau, est catalysée par des méthylases hautement spécifiques qui transfèrent le groupe méthyl de la S -adénosyl - L - méthionine sur les histones. Les histones riches en arginine semblent être un meilleur substrat que les histones riches en lysine.

Figure 1

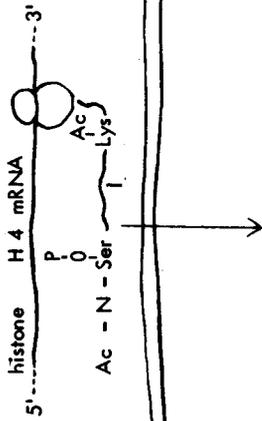
Synthèse et modifications structurales de l'Histone H 4 d'érythroblastes d'Oiseaux.

Dans le cytoplasme, l'histone H 4 nouvellement synthétisée est acétylée sur la sérine en position N-terminale et sur un résidu de lysine dans la chaîne polypeptidique. La sérine N-terminale est également phosphorylée.

En pénétrant dans le noyau, les molécules d'histone H 4 modifiées (forme I) sont déacétylées (forme II) et déphosphorylées (forme III). Plus tardivement, cette forme III peut être acétylée en 4 sites sur les résidus de lysine 5, 8, 12, 16 de la chaîne polypeptidique donnant ainsi les formes IV, V, VI, VII. La forme II phosphorylée peut aussi être acétylée et donner ainsi les formes I, VIII et IX.

Ces 9 formes ont été détectées dans les noyaux d'érythroblastes d'Oiseaux (RUIZ-CARRILLO et coll., 1975).

MODIFICATIONS CYTOPLASMIQUES



MODIFICATIONS NUCLEAIRES

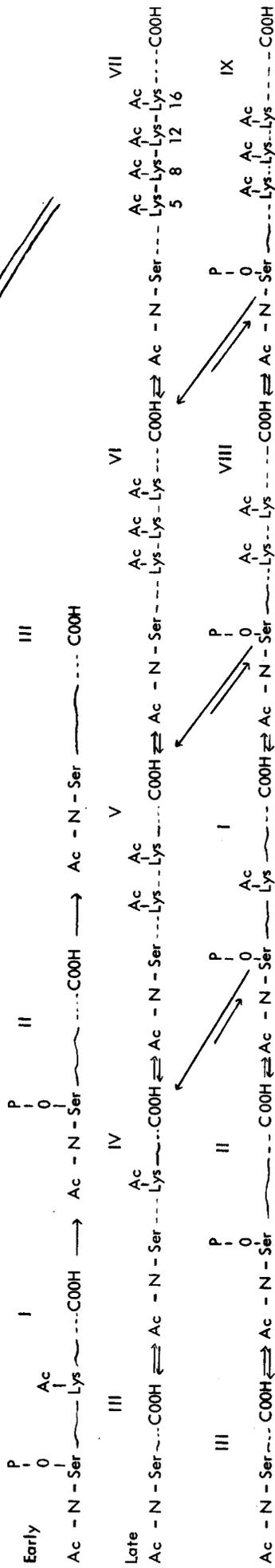


Figure 1



Plusieurs sites spécifiques de ϵ - N - méthylation ont été identifiés dans les histones :

L'histone H 4 de thymus de Veau est méthylée sur le résidu de lysine en position 20 (DE LANGE et coll., 1969 - c ; SAUTIERE et coll., 1970-a)

15 p. cent du résidu de lysine méthylée correspondent à un dérivé monométhylé et 85 p. cent à un dérivé diméthylé (DE LANGE et coll., 1969 - b).

L'histone H 3 est méthylée sur les résidus de lysine en position 9 et 27 donnant un mélange de dérivés monométhyl, diméthyl et triméthyllysine.

Les résidus de lysine méthylée dans les histones H3 et H 4 sont situés dans les régions polaires de ces protéines. La méthylation en augmentant la charge cationique et l'hydrophobicité de la molécule, pourrait accroître également la liaison de ces régions avec le D N A.

L'acétylation, la phosphorylation et la méthylation sont les modifications chimiques les plus importantes qui affectent la structure des histones.

En déplaçant les histones du D.N.A., l'acétylation et la phosphorylation diminueraient l'effet inhibiteur de ces protéines sur la synthèse du R.N.A.

B) LES PROTEINES NON-HISTONES (N.H.P.)

1) Caractérisation chimique

L'électrophorèse monodimensionnelle des N.H.P. en gel de polyacrylamide contenant du sodium dodecylsulfate (S.D.S.) révèle de 14 à 27 bandes. De nombreuses autres bandes mineures peuvent être mises en évidence par marquage radioactif (BORUN et STEIN, 1972 ; LEVY et coll., 1973) ou par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (ORRICK et coll., 1973, YEOMAN et coll., 1973).

Le poids moléculaire des N.H.P. se répartit entre 10.000 et plusieurs centaines de mille daltons.

Leur point isoélectrique est compris entre 3.7 et 9.0 (MAC GILLIVRAY et RICKWOOD, 1974).

La composition en acides aminés des N.H.P. non purifiés indique une richesse en acides aspartique et glutamique ou en leurs amides.

2) Spécificité de tissu

Les diagrammes électrophorétiques des N.H.P. varient d'un organe à l'autre ou d'une espèce à l'autre. (DAVIS et coll., 1972 ; ELGIN et BONNER, 1970, 1972).

Ces variations sont à la fois qualitatives et quantitatives mais elles ne concernent que quelques protéines ; en particulier les phosphoprotéines nucléaires ont été signalées pour leur spécificité d'espèces (TENG et coll., 1971) à la fois par les variations de leur taux de phosphorylation et par leur mobilité électrophorétique, ces deux caractéristiques étant vraisemblablement reliées.

La preuve la plus frappante de la spécificité de ces phosphoprotéines est dans l'étude de leur capacité à former des complexes avec le D.N.A. d'espèces variées.

Les interactions les plus fortes ont lieu avec le D.N.A. de la même espèce. Ainsi les phosphoprotéines de Rat se complexent bien avec le D.N.A. de Rat ; elles se complexent moins avec le D.N.A. de Souris et aucune interaction n'a lieu avec le D.N.A. de Veau.

Parmi les non-histones protéines, certaines semblent être spécifiques des espèces et des tissus : elles joueraient un rôle dans le contrôle de l'activité des gènes.

3) Rôle dans la régulation de l'activité des gènes.

Il est maintenant admis par de nombreux auteurs que le rôle de régulation de l'activité génétique précédemment attribué aux histones par STEDMAN et STEDMAN (1950), incomberait plutôt aux N.H.P.

En 1969, avec l'introduction de technique de reconstitution de la chromatine, BEKHOR et coll., ; HUANG et HUANG ; GILMOUR et PAUL, démontrent que les N.H.P. sont impliquées dans la transcription spécifique de la chromatine in vitro.

Tous ces travaux sont confirmés, un an plus tard, par GILMOUR et PAUL (1970), SPELSBERG et HNILICA (1970).

Selon STEIN et coll., (1975), les N.H.P. pourraient se lier spécifiquement au D.N.A. en reconnaissant certaines séquences nucléotidiques.

KLEINSMITH, en 1973, isole une fraction de N.H.P. phosphorylée qui active la transcription du D.N.A. in vitro alors qu'une autre fraction isolée des N.H.P. semble l'inhiber.

Les protéines chromosomales non-histones sont phosphorylées et déphosphorylées dans le noyau intact. Un turn-over rapide du phosphate a été observé par KLEINSMITH et coll., (1966) dans les érythrocytes d'Oiseaux.

La phosphorylation des protéines chromosomales non-histones semble jouer un rôle important dans la régulation de la transcription au cours du cycle cellulaire. En déphosphorylant spécifiquement les N.H.P. par une phosphatase, KLEINSMITH et coll., (1975), se sont aperçus qu'il y avait une réduction d'environ 50 p. cent du nombre de sites d'initiation de la transcription.

Enfin, la phosphorylation des N.H.P. peut être altérée au cours de la croissance des cellules, de la carcinogénèse ou du traitement par certaines drogues (KLEINSMITH, 1975).

L'altération de la phosphorylation des N.H.P. entraînerait des changements de structure de la chromatine qui impliquerait parallèlement une modulation de l'activité génétique.

C) DONNEES ACTUELLES SUR LA CHROMATINE

En modulant le degré de condensation et d'accessibilité du D.N.A., les interactions protéine - protéine et protéine - D.N.A. conditionnent la structure de la chromatine.

L'association étroite de la microscopie électronique, de la biophysique et de la biochimie ont permis d'énormes progrès, au cours de ces dernières années, dans l'étude de ces interactions et par conséquent dans la détermination de la structure de la chromatine.

L'existence d'unités fondamentales répétitives (*U* bodies ou nucléosomes) dans la chromatine a été mise en évidence par observation directe au microscope électronique : OLINS et OLINS (1974), OUDET et coll., (1975), VAN HOLDE et ISENBERG (1975), LANGMORE et WOOLEY (1975).

L'unité fondamentale est une particule sphérique dont le diamètre est estimé, suivant les auteurs, entre 60 et 130 Å .

Du fait que la fixation des particules par le formaldéhyde, nécessaire à leur visualisation, tend à réduire la taille apparente de l'unité fondamentale, le diamètre de 130 Å préconisé par OUDET serait probablement le plus proche de la réalité.

Le nucléosome est constitué pour moitié de D.N.A. et d'un octamère formé par quatre paires des différentes histones : H 2 A, H 2 B, H 3 et H 4. Ces histones interagiraient entre elles par leurs régions apolaires pour former un core protéique central autour duquel s'enroulerait le D.N.A.

L'extrémité N-terminale basique de chaque histone formant l'octamère, serait complexée, par liaison ionique, à une longueur de D.N.A. de 180 paires de bases. (BALDWIN et coll., 1975).

Dans ces régions N-terminales sont situés les centres basiques qui, en interagissant avec le D.N.A. situé à l'extérieur de l'unité globale seraient ainsi accessibles aux modifications chimiques que subissent les histones après

leur synthèse : en particulier, ceci est en parfait accord avec la mise en évidence de sites préférentiels de phosphorylation, d'acétylation et de méthylation au niveau de ces centres basiques. (Tableau III).

Un schéma détaillé de l'association des histones pour former l'octamère, est proposé par LI (1975) : chacune des histones H 2 A, H 2 B, H3 et H4 se dimérise : $(H 2 A)_2$, $(H 2 B)_2$, $(H 3)_2$, $(H 4)_2$, puis compte tenu des interactions préférentielles histone - histone (travaux de D'ANNA et ISENBURG, 1974), deux dimères s'unissent pour former un tétramère : $(H 2 A)_2 (H 2 B)_2$ d'une part, et $(H 3)_2 (H 4)_2$ d'autre part. Enfin, un octamère est formé par l'union de ces deux tétramères.

Cet octamère d'histones serait placé à l'intérieur de la double hélice du D.N.A. alors que l'histone H 1 serait fixée à l'extérieur et établirait des liens entre différentes parties du filament de chromatine : c'est le modèle de structure de la chromatine en "collier de perles" proposé par BALDWIN et coll., (1975) (Figure 2).

Des résultats comparables ont été obtenus par HEWISH et BURGOYNE (1973) par digestion de la chromatine de foie de Rat par des endonucléases.

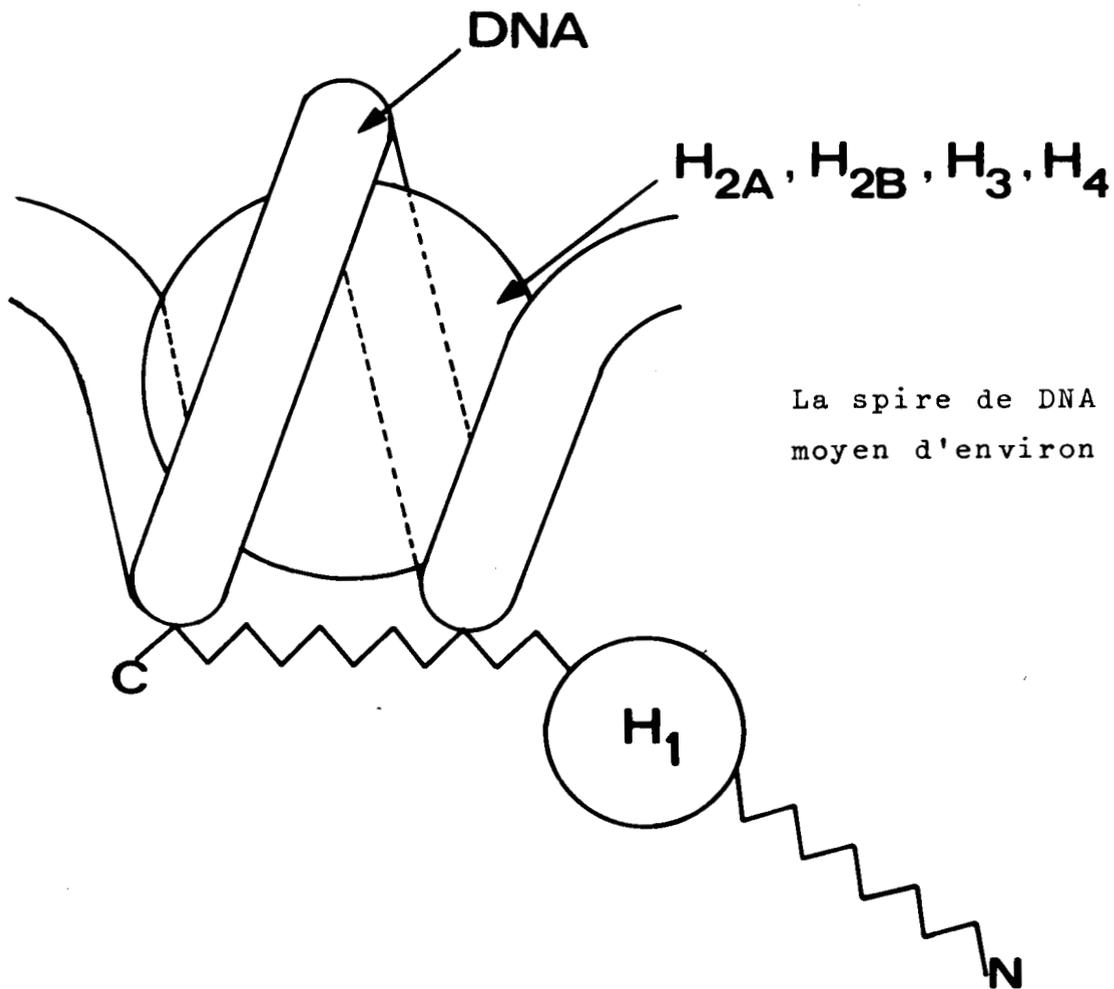
Ces auteurs obtiennent une série de fragments de D.N.A qui migrent, en électrophorèse en gel de polyacrylamide, comme s'ils étaient les multiples d'une unité de base, longue de 200 paires de bases. Ces fragments de D.N.A. seraient protégés de l'action de la nucléase par les protéines auxquelles ils sont associés.

D'autre part, les particules résistant à une action limitée de la nucléase ont été observées au microscope électronique. Leur masse moléculaire serait de 240.000, ce qui correspond à l'union de 150 à 200 paires de bases de D.N.A (130.000) et d'un octamère d'histones (110.000) (OUDET et coll., 1975) (NOLL et coll., 1975).

TABLEAU III

Histones de thymus de Veau	Principaux Sites de modification
H 3	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ - \text{Ala} - \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Ser} - \\ 9 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{Ac} \\ \\ - \text{Gly} - \text{Gly} - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Pro} - \text{Arg} - \text{Lys} - \\ 14 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{Ac} \qquad \qquad \qquad \text{Me} \\ \qquad \qquad \qquad \\ - \text{Ala} - \text{Thr} - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Arg} - \text{Lys} - \\ 23 \qquad \qquad \qquad 27 \end{array}$
H 4	$\begin{array}{c} \text{Ac} \qquad \qquad \qquad \text{Me} \\ \qquad \qquad \qquad \\ - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{His} - \text{Arg} - \text{Lys} - \\ 16 \qquad \qquad \qquad 20 \end{array}$
H 2 A	$\begin{array}{c} \text{PO}_4^{--} \\ \\ - \text{Arg} - \text{Ser} - \text{Ser} - \text{Arg} \\ 19 \end{array}$
H 2 B	$\begin{array}{c} \text{PO}_4^{--} \\ \\ \text{Lys} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{Ser} - \text{Lys} - \text{Lys} \\ 14 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{PO}_4^{--} \\ \\ \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Ser} - \text{Arg} \\ 32 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{PO}_4^{--} \\ \\ \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Glu} - \text{Ser} - \text{Tyr} \\ 36 \end{array}$





La spire de DNA a un diamètre moyen d'environ 100Å.

Figure 2

Représentation schématique de l'organisation de la chromatine en sous-unités répétitives selon BALDWIN J.P., BOSELEY P.G. et BRADBURY E.M., IBEL K., *Nature*, 253, 245-249 (1975).



Alors que la notion d'unité répétitive de structure de la chromatine est maintenant admise par tous, des divergences apparaissent sur l'existence de filaments de D.N.A. réunissant les différentes particules. Selon NOLL et coll., (1975) ; BAKAYEN et coll., (1975) ; FINCH et coll., (1975), les unités de structure seraient jointives.

Des techniques élaborées de diffraction des neutrons ont permis à BRAM (1975) de proposer un modèle très compact de structure de la chromatine où les unités globulaires jointives forment une fibre de 100 Å de diamètre entourée par une super-hélice de D.N.A. L'histone H 1 serait à l'extérieur de cet ensemble dont elle maintiendrait la conformation en même temps qu'elle fournirait des possibilités d'interaction avec d'autres unités et avec les protéines non-histones dont la localisation n'est pas déterminée.

Ce modèle proposé par BRAM présente l'avantage d'une très grande cohésion et explique le degré très élevé de repliement du D.N.A. dans le chromosome.

Néanmoins, malgré les énormes progrès réalisés ces dernières années dans la connaissance de la structure de la chromatine, de nombreux points restent à éclaircir et notamment celui de la nature et de la spécificité des interactions protéine - protéine et protéine - D.N.A. Ces interactions, étant modulées au cours du cycle cellulaire par les modifications chimiques (phosphorylation, acétylation, méthylation) des protéines, pourraient conduire à une reconnaissance mutuelle de macromolécules fondamentales en biologie : le D.N.A. et les protéines.

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE L'HISTONE H2B

A) PREPARATION DE LA CHROMATINE ET EXTRACTION SELECTIVE DES HISTONES

Pour tous les tissus sains ou tumoraux autres que le thymus, la préparation des histones comporte trois étapes :

- 1) isolement des noyaux en milieu aqueux (solution de saccharose)
- 2) préparation de la desoxyribonucléoprotéine fondée sur son insolubilité en milieu NaCl 0.14 M
- 3) extraction sélective des histones

Dans le cas du thymus, tissu pauvre en cytoplasme, la desoxyribonucléoprotéine est préparée directement à partir du tissu par homogénéisation en milieu NaCl 0.14 M .

La préparation et l'extraction des histones sont réalisées à 4° C en présence de diisopropylfluorophosphate pour inhiber toute protéolyse .

Obtention des tissus

Le thymus est prélevé sur des Rats Wistar âgés de 2 mois (x) .

La chloroleucémie du Rat est prélevée sur le Rat Wistar adulte pesant environ 250 g (x) .

(x) Les animaux proviennent de l'Institut de Recherches sur le Cancer .

Les tissus ont été excisés par Mesdames HERNO et TULLIER que nous remercions vivement .

Tissu sain et tumeurs sont congelés dans la neige carbonique immédiatement après excision et conservés à -30°C jusqu'à leur utilisation.

1) Préparation des noyaux

200 g de tissu sont émincés et homogénéisés dans 10 volumes d'une solution de saccharose 0.25 M - CaCl_2 - 3 m M - D F P $0,1 \text{ m M}$. L'homogénéisation est réalisée dans un Waring Blendor, pendant 1 minute, à faible vitesse.

Les débris de tissu conjonctif sont éliminés par filtration de l'homogénat à travers quatre épaisseurs de gaze. La solution est ensuite centrifugée à 1100 g pendant 30 minutes.

Le sédiment obtenu est constitué de noyaux souillés de cellules intactes et de mitochondries. Il est lavé deux fois par homogénéisation dans 5 volumes d'une solution de saccharose 0.25 M - CaCl_2 - 3 m M - D F P 0.1 m M et centrifugé pendant 30 minutes (SAUTIERE et coll., 1971).

Les noyaux ainsi obtenus sont finalement purifiés par homogénéisation dans 250 ml d'une solution de saccharose 2.2 M - CaCl_2 - 3 m M contenant 0.15 p. 100 de Triton X - 100. Le Triton X - 100 est un détergent non-ionique qui décape la membrane nucléaire.

La suspension est centrifugée à 36000 g pendant 90 minutes. Le sédiment obtenu constitue les noyaux. Ce sont les seules structures cellulaires dont la densité (1,4) soit supérieure à celle de la solution de saccharose $2,2 \text{ M}$ (1.28)

La pureté de la préparation a été contrôlée au microscope en contraste de phase.

2) Préparation de la désoxyribonucléoprotéine

a) à partir des noyaux

Le sédiment contenant les noyaux obtenus précédemment, est homogénéisé dans un Waring Blendor, pendant une minute, à grande vitesse, dans 500 ml d'une solution NaCl 0.14 M - citrate trisodique 0.01 M, pH 7.1 en présence de D F P 0.1 m M.

La membrane nucléaire est alors rompue et deux lavages sont effectués avec la même solution. Le sédiment obtenu après centrifugation est traité par 500 ml de tampon Tris 0.1 M, pH 7.6 (STEELE et coll., (1963)).

La désoxyribonucléoprotéine obtenue est lavée deux fois par homogénéisation dans l'éthanol à 80 p. 100, puis recueillie par centrifugation à 1100 g pendant 15 minutes.

Le sédiment est retenu pour l'extraction ultérieure des histones.

b) à partir du tissu

Cette méthode ne s'applique qu'aux tissus dont les cellules possèdent un énorme noyau et peu de cytoplasme : c'est le cas du thymus.

La préparation de la désoxyribonucléoprotéine est fondée sur son insolubilité dans le chlorure de sodium 0.14 M. La préparation est effectuée en présence de diisopropylfluorophosphate (D F P), de fluorure de phenylmethanesulfonyle (P M S F) ou de bisulfite de sodium pour inhiber toute activité protéolytique.

L'utilisation de ces inhibiteurs est indispensable car PANYIM et coll., (1968) ont mis en évidence la dégradation protéolytique des macromolécules en étudiant l'accroissement de la solubilité de la D.N.P. dans le chlorure de sodium 0.14 M . Parallèlement, ils ont observé l'augmentation de la mobilité électrophorétique du complexe nucléoprotéique.

150 g de thymus de Rat provenant d'environ 400 animaux sont homogénéisés en milieu $\text{NaCl } 0.14 \text{ M}$ - citrate trisodique 0.01 M , pH 7.1, D F P 0.1 m M , dans un Waring Blendor pendant 1 minute à grande vitesse.

L'homogénat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et centrifugé à 1100 g pendant 30 minutes.

Le sédiment obtenu est lavé 5 fois encore dans la même solution puis finalement lavé dans l'éthanol à 80 p.100.

3) Extraction des histones

La dissociation des histones de la chromatine peut être réalisée par :

- des solutions salines
- les acides inorganiques

a) dissociation de la chromatine par des solutions salines

20 p. 100 des histones sont dissociées du D N A par une solution de $\text{NaCl } 0.6 \text{ M}$. A cette force ionique pour laquelle toutes les interactions électrostatiques entre le D N A et les histones, sont supprimées, seule l'histone H 1 est dissociée du D N A. Pour déplacer les autres histones une concentration beaucoup plus élevée en NaCl (jusqu'à 2 M) est requise

TOCZKO et KALINSKI (1974) ont montré que les histones et le D N A étaient non seulement associés par des liaisons ioniques mais également par des liaisons hydrophobes sensibles à l'action de détergent non-ionique comme le Triton X - 100.

Ainsi, toutes les histones peuvent être dissociées du D N A par une solution de NaCl 0.6 M contenant 0.15 p. 100 de Triton X - 100.

Toutefois, nous n'avons pas retenu cette méthode en raison des difficultés rencontrées pour séparer les histones ainsi obtenues.

b) dissociation de la chromatine par les acides inorganiques

- extraction des histones totales.

Les histones sont globalement extraites de la désoxyribonucléoprotéine par des solutions d'acide dilué : HCl 0.25 N ou H_2SO_4 0.2 N.

- extraction sélective des histones.

Nous avons utilisé les méthodes 1 et 2 de JOHNS (1964), (1967).

Les fractions $F_2 a_1$ et $F_2 a_2$ sont extraites directement à partir de la désoxyribonucléoprotéine par le mélange éthanol-chlorhydrate de guanidine à 40 p. 100, pH 7 (3 : 1 ; v/v) et séparées par précipitation différentielle à l'acétone (JOHNS , 1967).

La fraction F 3 est extraite 3 fois par le mélange éthanol- HCl 1.25 N (4 : 1 ; v/v) (JOHNS , 1964). Le sédiment obtenu contient essentiellement les fractions riches en lysine F 1 et F 2 b mais aussi des fractions riches en arginine qui n'ont pas été éliminées précédemment. C'est pourquoi le sédiment obtenu est extrait 3 fois avec le mélange éthanol-HCl 0.83 N

(7 : 3 ; v/v) pour éliminer le plus complètement possible les fractions F 2 a 1, F 2 a 2 et F 3 (GOUREVITCH M., Communication personnelle).

Les histones riches en lysine H 1 et H 2 B sont ensuite extraites dans les fractions F 1 et F 2 b par une solution d'HCl 0.25 N . Les fractions F 1 et F 2 b sont séparées par précipitation différentielle à l'acétone (JOHNS, 1964)

Nous avons rassemblé dans le tableau IV les différentes étapes de la préparation des histones .

Les étapes terminales de cette préparation (Figure 3) ainsi que les étapes ultérieures de purification sont contrôlées par électrophorèse en gel de polyacrylamide .

4) Contrôle électrophorétique des différentes étapes de préparation et de purification des histones

Les étapes de préparation et de purification des histones sont contrôlées par électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide . Cette technique sépare les histones suivant leur taille moléculaire et leur charge électrique .

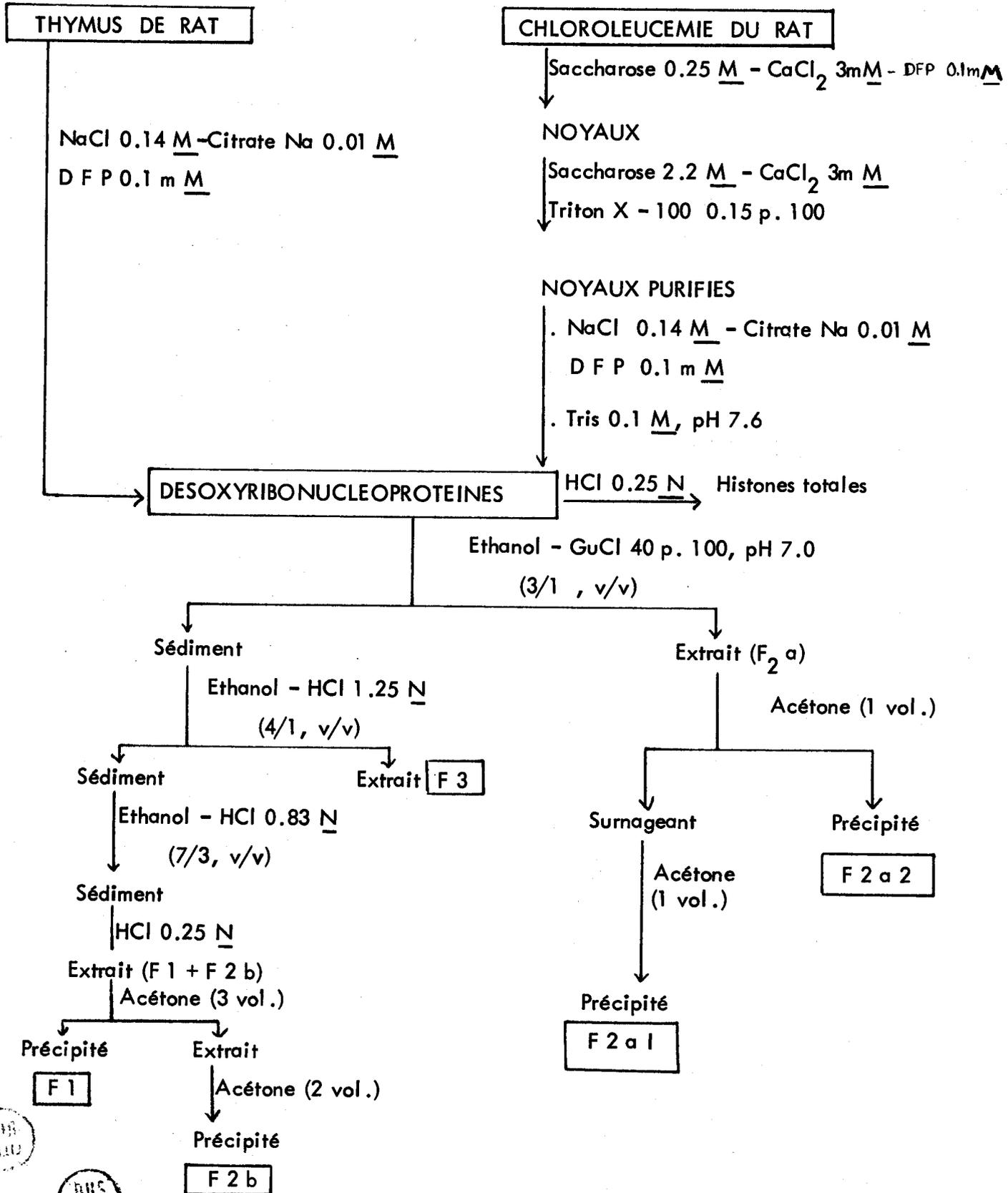
Nous avons réalisé l'électrophorèse à pH 2.7, en milieu urée 2.5 M, selon la méthode décrite par PANYIM et CHALKLEY (1969) mais avec une concentration en acrylamide de 17 p. 100.

Les gels sont soumis à une préélectrophorèse pendant 15 heures, sous une intensité constante de 1,5 mA/tube .

L'échantillon est dissous, 24 heures avant l'électrophorèse, dans la solution : HCl 0.01 N - urée 8 M - β - mercapto-éthanol 1 p.100 (1 mg de protéine/ 1ml de solution).

TABLEAU IV

PREPARATION DES HISTONES



2113
31112

BNS
BILLE

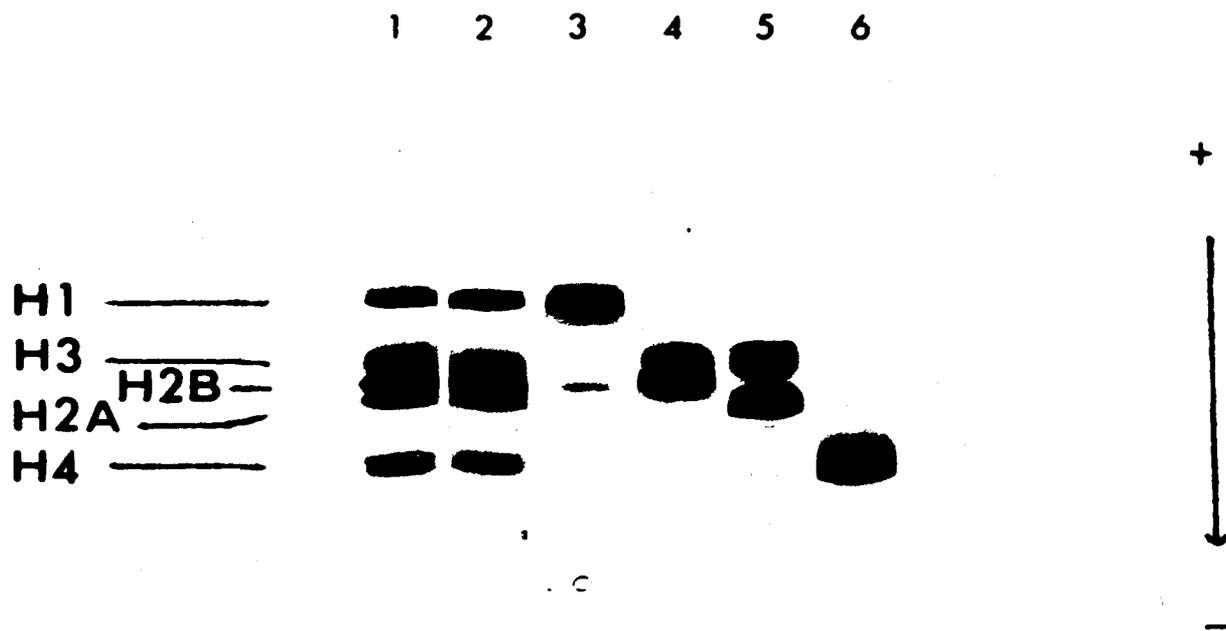


Figure 3

Diagramme électrophorétique des fractions d'histones obtenues par les méthodes de JOHNS.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée selon la méthode de PANYIM et CHALKLEY (1969) en milieu urée 2.5 M à pH 2.7.

Dépôt : 10 μ l d'une solution de protéine à 1 mg/ml
HCl 0.01 N - urée 8 M - β -mercaptoéthanol 1 %.

Migration : 4 heures sous une intensité de 1,5 mA/tube.

Coloration : Amidoschwarz 10 B pendant 30 minutes.

- 1 : Histones totales de thymus de Veau.
- 2 : Histones totales de thymus de Rat.
- 3 : Fraction F1 de thymus de Rat.
- 4 : Fraction F2b de thymus de Rat.
- 5 : Fraction F2a2 de thymus de Rat.
- 6 : Fraction F2a1 de thymus de Rat.



L'électrophorèse est effectuée pendant 4 heures sous une intensité constante de 1,5 mA / tube.

Les gels sont colorés pendant 30 minutes avec une solution d'Amido-schwarz à 1 p. cent dans le mélange acide acétique - éthanol - eau (7 : 20 : 73 ; v/v) puis décolorés pendant 48 heures dans le même système solvant.

B) ISOLEMENT DE L' HISTONE H 2 B

La fraction F 2 b que nous avons obtenue après avoir extrait à plusieurs reprises les histones riches en arginine, est très hétérogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 3 - gel 4). L'histone H 2 B qui en est le composant majeur, apparaît fortement contaminée par l'histone H 3 et légèrement contaminée par l'histone H 2 A. Ceci est en parfait accord avec les travaux de SENSHU et IWAJ (1970).

D'autres composants de migration plus lente sont également présents dans la fraction F 2 b : il s'agit vraisemblablement de protéines non-histones acido solubles.

De nombreuses méthodes ont été décrites pour débarrasser l'histone H 2 B de ces contaminants.

Ces méthodes sont basées :

- soit sur la chromatographie d'échange d'ions : IWAJ et coll., (1970) ; HNILICA et coll., (1970) ; SKANDRANI et coll., (1972)
- soit sur la chromatographie de gel filtration : BOHM et coll., (1973) ; VAN DER WEST-HUYZEN et coll., (1974) ; SOMMER et CHALKLEY (1974).

1) Essais d'isolement de l'histone H 2 B par des méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques proposées indépendamment par IWAJ (1970) et par HNILICA (1970) nécessitent de longues et fastidieuses étapes avec emploi de différents supports qui nécessitent un matériel de départ abondant.

Nous avons préféré utiliser la méthode proposée par SKANDRANI et coll. (1972). La chromatographie d'échange d'ions est réalisée sur Amberlité I R C 50 en tampon phosphate de sodium 0.1 M, pH 6,8 avec un gradient de 8 à 15 p. 100 en chlorhydrate de guanidine.

Cette méthode ne nous a pas permis d'isoler l'histone H 2 B dans un état de pureté satisfaisant. La mauvaise qualité d'un lot de résine Biorex 70 est à l'origine de cet échec.

D'autre part, le rendement faible obtenu était pour nous un sérieux handicap puisque notre matériel de départ est constitué, soit d'une tumeur expérimentale du Rat, soit de thymus de Rat, ce qui nécessite l'élevage et le sacrifice de nombreux animaux.

Nos essais de purification ont alors été poursuivis en utilisant la chromatographie de gel filtration :

- sur colonne de Sephadex G - 100 en milieu HCl 0.01 N
- urée 4 M
- sur colonne de Biogel P 60 en milieu HCl 0.02 N - NaCl 0.05 M - NaN_3 0.02 %, pH 1.7 (VANDER WESTHUYZEN et coll., 1974).

Aucune de ces méthodes ne nous a permis d'isoler à l'état pur, l'histone H 2 B à laquelle reste attachée vraisemblablement sous forme de complexe l'histone H 2 A.

Nous nous sommes alors tournée vers l'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide, méthode qui présente l'avantage d'isoler en une seule étape et à l'état très pur, l'histone H 2 B à partir de la fraction F 2 b de JOHNS.

2) Isolation de l'histone H 2 B par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est réalisée sur des plaques de gel polyacrylamide (20 x 15 x 0.5 cm) dans un appareil identique à celui décrit par KALTSCHMIDT et WITTMANN (1970), pour la séparation des protéines ribosomales. Cet appareil peut contenir quatre plaques. Le gel est préparé en milieu acide acétique 0.9 M, urée 2.5 M ; la concentration en acrylamide est de 17 p. cent.

L'échantillon (50 mg) est dissous dans 10 ml d'une solution d'HCl 0.01 M - urée 8 M et 2.5 ml de cette solution sont déposés sur chaque plaque. L'électrophorèse est réalisée à 100 volts pendant 15 heures à la température du laboratoire (MARTINAGE et coll., 1976).

Après migration, deux bandes latérales (de 1,5 cm de large chacune) sont découpées et colorées au bleu de Coomassie à 0.25 p. cent dans l'acide acétique à 9 p. 100.

Les protéines ainsi repérées, nous découpons dans la plaque de gel non colorée, la bande correspondant à l'histone purifiée.

Le gel est ensuite broyé dans un Waring Blendor pendant 10 secondes à basse vitesse dans 100 ml d'HCl 0.02 M.

La suspension est mélangée pendant 1 heure dans un agitateur secoueur (Prolabo) à 4°C et centrifugée à grande vitesse (6000t / mn). Cette opération est répétée deux fois encore mais en prolongeant le temps d'extraction.

Les extraits centrifugés sont rassemblés et filtrés 2 fois sur filtre Millipore : une fois sur filtre de taille de pores $1,2 \mu$ et une fois sur filtre de taille de pores $0,22 \mu$. Ils sont ensuite dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés.

Les dernières traces de polyacrylamide sont éliminées par chromatographie de gel filtration sur colonne de Biogel P 60.

La colonne ($2,6 \times 90$ cm) est équilibrée en milieu HCl 0.01 M , NaCl 0.05 M et NaN_3 0.02% .

Le débit de la colonne est de 28 ml/h

Dans ces conditions, les volumes d'élution de la polyacrylamide et de l'histone H 2 B sont respectivement de 170 ml et de 310 ml . La courbe d'élution est présentée dans la Figure 4.

L'histone H 2 B ainsi préparée est obtenue à l'état très pur (Figure 5) avec un rendement d'environ 40 p. cent .

C) CARACTERISATION DE L'HISTONE H 2 B

1) comportement électrophorétique

Le comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide est un critère simple pour la caractérisation des histones.

Dans les conditions opératoires décrites précédemment, l'histone H 2 B a un comportement cathodique intermédiaire entre les histones H 3 et H 2 A.

2) composition en acides aminés

Nous avons déterminé la composition en acides aminés de l'histone H 2 B après hydrolyse par l'HCl 6 N (1 ml par mg de protéine) à 110°C en tubes scellés sous vide, pendant 24 et 72 heures. L'addition d'une goutte de phénol à 1 p. cent permet d'éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

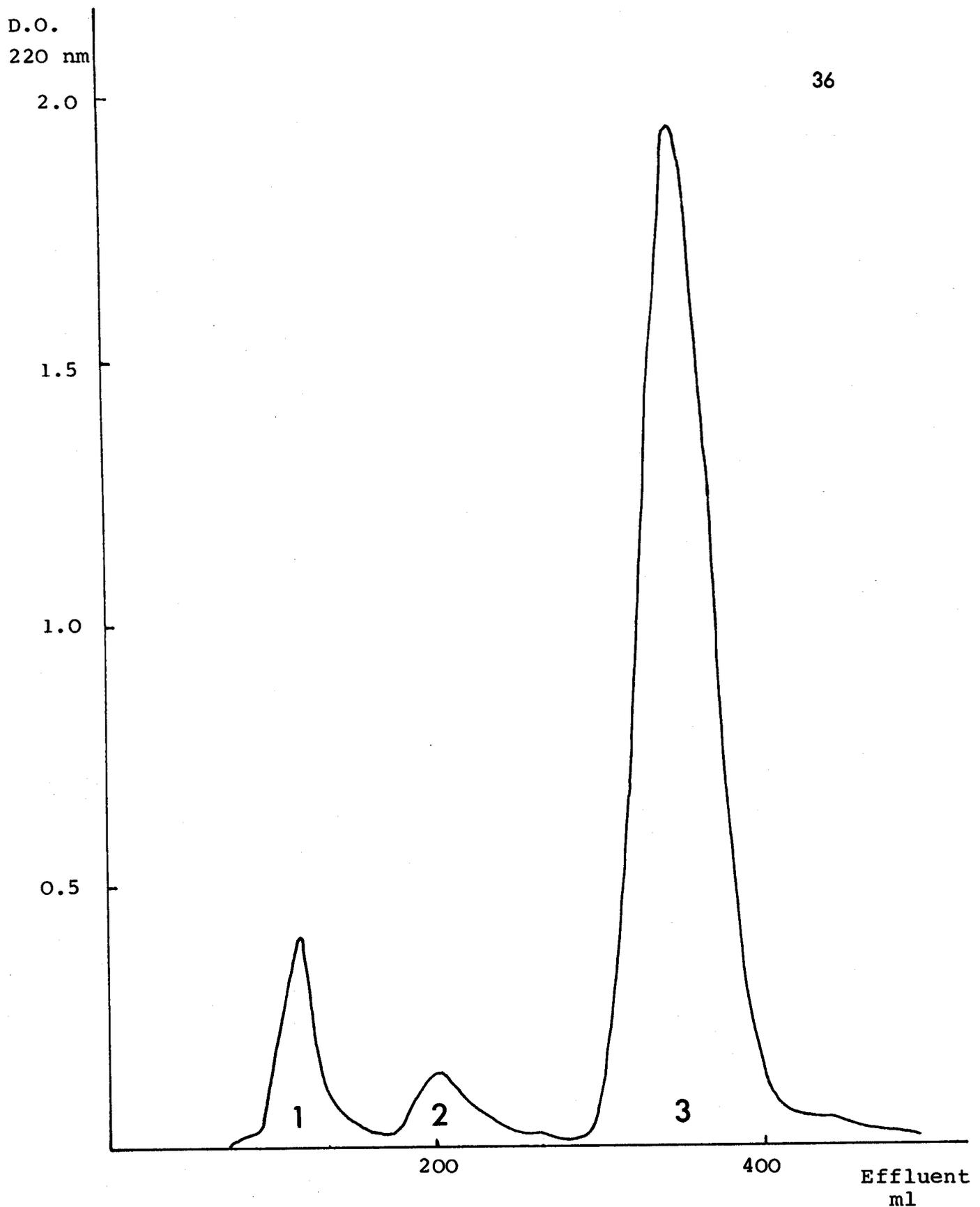


Figure 4

Elimination de l'acrylamide de l'histone H2B par gel filtration sur Biogel P 60.



Les fractions 1 et 2 correspondent à la polyacrylamide.

La fraction 3 correspond à l'histone H2B obtenue dans un état de pureté très satisfaisant.

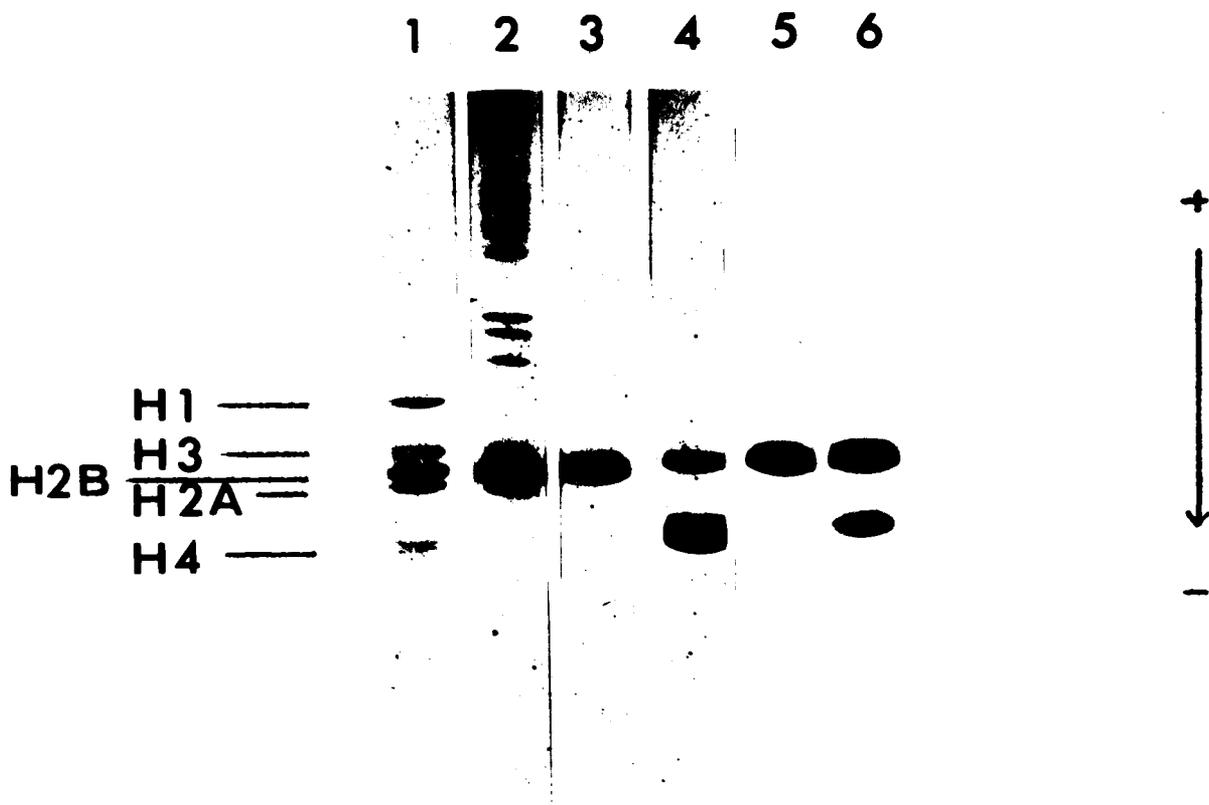


Figure 5

Contrôle électrophorétique de l'homogénéité de nos préparations d'histone H2B.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée selon la méthode de PANYIM et CHALKLEY (1969) en milieu urée 2.5 M à pH 2.7.

Dépôt : 10 μ l d'une solution de protéine à 1 mg/ml
HCl 0.01 N - urée 8 M - β -mercaptoéthanol 1 %.

Migration : 4 heures sous une intensité de 1,5 mA/tube.

Coloration : Amidoschwarz 10 B.

- 1 : Histones totales de Chloroleucémie du Rat.
- 2 : Fraction F2b de Chloroleucémie du Rat.
- 3 : Histone H2B de Chloroleucémie du Rat.
- 4 : Histone H2B de Chloroleucémie du Rat + histone H4 utilisée comme marqueur.
- 5 : Histone H2B de thymus de Rat.
- 6 : Histone H2B de thymus de Rat + histone H4 utilisée comme marqueur



L'analyse des acides aminés est effectuée sur un analyseur BECKMAN, type Multichrom A; équipé d'un intégrateur INFOTRONICS C R S 210.

La séparation est effectuée avec un système mono-colonne, (0.6 x 32 cm) sur résine Aminex A A 20 (BECKMAN), thermostatée à 50°C ; le débit du tampon est de 35 ml/h ; celui du réactif à la ninhydrine est de 17,5 ml/h.

L'élution des acides aminés se fait selon un procédé adapté de Moore et STEIN, à l'aide de 3 tampons de pH croissant et de molarité croissante en sodium.

- Tampon 1, pH 3.25

ion citrate	0.2 M
<u>ion sodium</u>	0.2 M
thiodiglycol	<u>2.5 ‰</u>
acide n-caprylique	0.1 ‰
méthanol	20 ‰

Le pH est amené à 3,25 par addition d'HCl concentré.

L'addition de méthanol au tampon 1 permet d'obtenir une séparation satisfaisante de la thréonine et de la sérine.

- tampon 2, pH 4.12

ion citrate	0.2 M
<u>ion sodium</u>	0.4 M
thiodiglycol	<u>2.5 ‰</u>
acide n-caprylique	0.1 ‰

Le pH est amené à 4.12 par addition d'HCl concentré.

- tampon 3, pH 6.40

ion citrate	0.2 <u>M</u>
<u>ion sodium</u>	1 <u>M</u>
acide n-caprylique	<u>0.1%_{oo}</u>

Le pH est amené à 6.40 avec de l'HCl concentré.

Les deux premiers tampons permettent l'élution des acides aminés acides et neutres. Le troisième assure l'élution des acides aminés basiques.

Les résultats sont présentés dans le Tableau V.

La composition en acides aminés de l'histone H 2 B isolée d'un tissu sain (le thymus de Rat) ou d'un tissu néoplasique chez le même animal (chloroleucémie du Rat) ne présente aucune différence par rapport à celle de l'histone homologue de thymus de Veau.

Outre la richesse de la protéine en résidus de lysine, sérine et alanine, il faut noter la présence de 5 résidus de tyrosine, 2 résidus de méthionine, et l'absence de N - ϵ - methyllysine.

D'autre part, l'histone H 2 B contient un nombre équivalent de résidus hydrophobes (x) (31), de résidus hydroxylés (xx)(27) et de résidus basiques (xxx)(31).

Le poids moléculaire, calculé sur la base de 125 résidus, est de 13.774 daltons (IWAJ et coll., 1970).

Le rapport lysine/arginine est de 2.5

(x) Résidus hydrophobes : Valine, Leucine, Isoleucine, Methionine, Phenylalanine et Proline.

(xx) Résidus hydroxylés : Sérine, Thréonine et Tyrosine

(xxx) Résidus basiques : Histidine, Lysine, Arginine

TABLEAU V : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H 2 B

Les valeurs obtenues, exprimées en moles d'acides aminés pour 100 moles sont les moyennes de 8 déterminations réalisées sur des hydrolysats de 24 et 72 heures.

Les valeurs de la thréonine et de la sérine sont obtenues par extrapolation linéaire au temps zéro de l'hydrolyse.

Les valeurs de la valine, l'isoleucine et la leucine sont les valeurs obtenues après 72 heures d'hydrolyse.

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

(x) Les valeurs données pour l'histone H 2 B de thymus de Veau sont celles trouvées par HNILICA et coll., (1970).

(xx) Les valeurs entre parenthèses ont été déduites de l'étude de la séquence

TABLEAU V

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE L'HISTONE H 2 B

Acides aminés	Moles d'acides aminés pour 100 moles			Résidus calculés		
	Thymus de Rat	Chloroleucémie du Rat	Thymus de Veau (x)	Thymus de Rat	Chloroleucémie du Rat	Thymus de Veau (x)
Acide aspartique	5.28	5.40	4.9	6.6 (6) ^{xx}	6.7 (6) ^{xx}	6
Thréonine	6.19	6.22	6.1	7.7 (8)	7.8 (8)	8
Sérine	11.13	11.10	10.7	13.9 (14)	13.9 (14)	14
Acide glutamique	8.60	8.02	7.6	10.7 (10) ^{xx}	10.0 (10)	10
Proline	4.56	4.76	4.8	5.7 (6)	6.0 (6)	6
Glycine	6.61	6.42	5.5	8.3 (7) ^{xx}	8.0 (7)	7
Alanine	10.59	10.46	10.1	13.2 (13)	13.0 (13)	13
Valine	6.98	7.35	7.0	8.7 (9)	9.2 (9)	9
Méthionine	1.24	1.00	1.5	1.6 (2)	1.3 (2)	2
Isoleucine	4.71	4.61	4.9	5.9 (6)	5.8 (6)	6
Leucine	5.46	5.35	4.9	6.8 (6) ^{xx}	6.7 (6) ^{xx}	6
Tyrosine	3.58	3.54	3.8	4.5 (5)	4.4 (5) ^{xx}	5
Phénylalanine	1.46	1.60	1.6	1.8 (2)	2.0 (2)	2
Histidine	2.22	2.36	2.2	2.8 (3)	3.0 (3)	3
Lysine	15.76	15.28	16.6	19.7 (20) ^{xx}	19.1 (20) ^{xx}	20
Arginine	6.42	6.52	6.2	8.0 (8)	8.1 (8)	8
Nombre de résidus				125	125	125
Rapport Lys/arg				2.5	2.5	2.5
N-terminal				Pro	Pro	Pro
C-terminal				Lys	Lys	Lys

3) détermination de l'extrémité N-terminale

L'acide aminé en position N-terminale de l'histone H 2 B de Rat (thymus et chloroleucémie) a été déterminée par dansylation selon la méthode de GROS et LABOUESSE (1969). Comme dans l'histone homologue de thymus de Veau, l'acide aminé ainsi identifié est la proline.

4) Détermination de l'extrémité C-terminale

L'extrémité C-terminale de l'histone H 2 B a été déterminée par une étude cinétique de l'hydrolyse de la protéine avec les carboxypeptidases B et A (x).

- préparation de la solution de carboxypeptidase A

Pour éliminer les acides aminés libres, la suspension de carboxypeptidase A est lavée 5 fois avec 2 ml d'eau distillée glacée.

L'enzyme est ensuite dissous dans 1 ml de chlorure de lithium à 10 p. 100.

- hydrolyse de l'histone H 2 B

1,4 mg d'histone H 2 B correspondant environ à 100 nanomoles sont dissous dans 0.5 ml de N-méthylmorpholine 0.1 M, pH 8.0. Après une hydrolyse de 2 heures à 40°C par la carboxypeptidase B (rapport enzyme/substrat : 1/50) on ajoute la carboxypeptidase A. Des prélèvements, correspondant à 20 nanomoles, effectués à différents temps d'hydrolyse, sont recueillis dans 0.5 ml d'acide acétique à 30 p.100 et évaporés à sec.

L'analyse des acides aminés libérés est effectuée à l'aide d'un autoanalyseur Beckman type Multichrom A.

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau VI.

Nous avons pu en déduire la séquence C-terminale :

Ser - Lys (OH).

(x) Carboxypeptidase A (E C 3. 4. 2. 1)(Worthington)traitée par le D F P

Carboxypeptidase B (E C 3. 4. 2. 2)(Worthington)traitée par le D F P

TABLEAU VIETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'HISTONE H 2 BPAR LES CARBOXYPEPTIDASES B ET A

Chaque prélèvement correspond à 20 nanomoles

Les résultats sont exprimés en nombre de nanomoles d'acides aminés libérés.

Acides aminés	CpB 2 ^h	Cp B 2 ^h CpA 15 mn	Cp B 2 ^h Cp A 30mn	Cp B 2 ^h Cp A 60mn	Cp B 2 ^h Cp A 3 ^h
Thréonine		3.198	4.532	6.858	14.203
Sérine		<u>4.611</u>	<u>6.439</u>	<u>8.416</u>	<u>14.394</u>
Alanine		3.501	4.873	6.847	11.643
Valine		3.437	4.603	7.249	10.097
Tyrosine		3.517	4.252	7.179	11.731
Lysine	<u>12.665</u>	15.868	17.287	17.962	<u>25.904</u>



CHAPITRE II

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H2B

A) STRATEGIE

B) METHODES

- 1) coupure au bromure de cyanogène
- 2) hydrolyse trypsique
- 3) dégradation automatique d'Edman

C) RESULTATS

- 1) coupure de l'histone H 2 B par le bromure de cyanogène
- 2) étude des peptides tryptiques
- 3) détermination de l'extrémité N-terminale par dégradation automatique d'Edman
- 4) discussion

CHAPITRE II

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H 2 B

A) STRATEGIE

La composition en acides aminés des histones H 2 B de chloroleucémie et de thymus de Rat est semblable à celle de l'histone homologue de thymus de Veau. On peut donc s'attendre à ce que les histones H 2 B de Rat aient une structure primaire identique sinon analogue à celle de l'histone H 2 B de Veau.

Nous avons cependant entrepris l'étude de la séquence en acides aminés de cette protéine dans un double but :

1) cette étude nous a permis de mettre au point les techniques de coupure de la protéine et de séparation des peptides en vue de travaux ultérieurs sur la détermination des sites de phosphorylation de l'histone H 2 B : ces travaux font l'objet de la deuxième partie de ce mémoire.

2) les techniques que nous avons utilisées seront appliquées aux études structurales qui seront réalisées dans notre laboratoire sur les histones H 2 B d'érythrocyte de Poulet, d'Oursin et de Pois.

Nous nous sommes d'abord attachée à la détermination de la structure primaire de l'histone H 2 B de chloroleucémie de Rat.

La protéine renferme 2 résidus de méthionine situés vraisemblablement au centre de la chaîne peptidique comme HNILICA et coll., (1970) et IWAI et coll., (1970) l'ont montré pour l'histone H 2 B de thymus de Veau.

Notre première démarche a donc consisté à couper la protéine par le bromure de cyanogène de façon à obtenir 3 fragments que l'on pouvait facilement aligner et replacer dans la séquence de la protéine. Les fragments N- et C- terminaux présentaient l'intérêt de correspondre à la moitié de l'histone H 2 B.

Nous avons ensuite prévu de soumettre chacun de ces fragments isolés à l'hydrolyse trypsique : les hydrolysats ainsi obtenus seraient moins complexes que l'hydrolysat trypsique de la protéine "native".

Malheureusement, nous nous sommes heurtée à 2 écueils :

- difficulté de séparer totalement les fragments N- et C- terminaux de poids moléculaires voisins sans toutefois égarer le tripeptide central. Pour cela, plusieurs étapes chromatographiques étaient nécessaires et nous avons été confrontée alors à un deuxième problème :

- perte de la souche de chloroleucémie, entretenue à Villejuif, à partir de laquelle nous obtenions les tumeurs par transplantations successives.

Pour cette raison et compte tenu du peu de matériel dont nous disposions, nous avons décidé d'entreprendre l'étude de la structure primaire sur le mélange des 2 fragments N- et C- terminaux.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'histone H 2 B de thymus de Rat, mais en raison des difficultés rencontrées pour la chloroleucémie, nous avons hydrolysé la protéine native par la trypsine sans la soumettre à une coupure préalable par le bromure de cyanogène.

La séquence en acides aminés des peptides tryptiques a été déterminée et leur localisation dans la séquence a été effectuée en tenant compte des résultats obtenus par IWAI et coll. (1970) sur l'histone H 2 B de thymus de Veau.

Enfin, l'histone H 2 B présente l'avantage d'avoir son extrémité N-terminale libre. C'est pourquoi, alors que nous n'avions pas encore retrouvé, dans l'hydrolysate tryptique, le peptide N-terminal de la protéine, nous avons envisagé de soumettre l'histone H 2 B de thymus de Rat à la dégradation automatique d'Edman à l'aide d'un séquenceur opérant en phase liquide.

B) M E T H O D E S

1) Coupure au bromure de cyanogène.

La coupure au bromure de cyanogène a été réalisée sur l'histone H2 B de chloroleucémie de Rat suivant la méthode de GROSS et WITKOP (1962).

126 mg de protéine correspondant à 9μ moles environ sont dissous dans une solution d'acide formique à 70 p. cent. On y ajoute 191 mg de bromure de cyanogène (100μ moles/ μ mole de méthionine). Le mélange réactionnel placé en atmosphère d'azote est maintenu à 34 °C., à l'obscurité, sous agitation magnétique pendant 24 heures.

Le mélange est ensuite dilué et lyophilisé.

Les produits de clivage ont été fractionnés par chromatographie de gel filtration en milieu HCl 0.01 N. Une première chromatographie a été effectuée sur colonne de Sephadex G 25 F pour séparer les gros fragments et un tripeptide. Une seconde chromatographie a été effectuée sur colonne de Sephadex G 50 F pour fractionner les gros fragments.

Une tentative de purification des fragments N- et C-terminaux a été réalisée par chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose C M 52 équilibrée en tampon acétate de sodium 0.125 M, pH 4.3 et éluée avec un gradient de 0 à 1 M en NaCl dans le même tampon.

2) hydrolyse trypsique

Conformément à la stratégie que nous avons adoptée, nous avons, dans un premier temps, soumis à l'hydrolyse trypsique, les fragments N- et C- terminaux obtenus par coupure de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat, avec le bromure de cyanogène.

Au terme de cette expérimentation, trois peptides trypsiques n'ayant pas été retrouvés, nous avons décidé de refaire une hydrolyse trypsique sur l'histone H 2 B intacte de chloroleucémie du Rat.

Parallèlement nous avons réalisé l'hydrolyse de l'histone H 2 B de thymus de Rat.

a) conditions d'hydrolyse

L'hydrolyse est réalisée en milieu bicarbonate d'ammonium 0.1 M, pH 8.0, par la TPCK-trypsine (x), à 37°C pendant 2 heures. L'enzyme, utilisé dans un rapport final enzyme/substrat de 1/50, est ajouté au temps zéro et après 1 heure d'hydrolyse. L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par abaissement du pH à 3.5 avec de l'acide formique pur.

L'hydrolysats lyophilisé est repris par 2 ml d'acide formique à 10 p. 100.

b) fractionnement des peptides trypsiques

Les peptides trypsiques de l'hydrolysats sont séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de chromobeads P (xx) (100 x 0,635 cm) équilibrée dans un tampon pyridine 0.1 M acide formique, pH 2.9, et thermostatée à 60°C.

L'élution des peptides est réalisée selon SAUTIERE et coll., (1970) avec un gradient de pH croissant -pH 2.9 à pH 5.0 - et de molarité croissante en pyridine - 0.1 M à 2 M

(x) Trypsine traitée par le TPCK : L - (1 - tosylamide - 2 - phenyl) ethyl chloro-méthyl Kétone

(xx) La résine chromobeads P est une résine cationique type Dowex 50 x 2, soigneusement calibrée et commercialisée par Technicon Corporation.

Ce gradient est obtenu avec un appareil Varigrad à 9 cellules contenant chacune 200 ml de tampon (Tableau VII).

Après le passage du gradient, l'éluion des peptides basiques est poursuivie pendant 24 heures avec un tampon pyridine 2 M - acide acétique, pH 5.0

Le repérage des peptides dans l'éluat est effectué par la réaction à la ninhydrine à l'autoanalyseur TECHNICON, sur des aliquotes prélevées automatiquement.

Les fractions correspondant à un pic d'éluion sont rassemblées et évaporées à sec sous vide à l'aide d'un Rotary Evapomix Buchler équipé d'un piège à neige carbonique. Chaque fraction peptidique est ensuite dissoute dans 1 ml d'acide acétique à 10 p. 100 et conservée à - 20°C.

c) contrôle d'homogénéité et purification des fractions peptidiques

L'analyse des fractions peptidiques est effectuée par électrochromatographie sur papier Whatmann 3 MM lavé pendant 48 heures à l'acide acétique à 10 p.100. La chromatographie est réalisée pendant 18 heures dans le solvant : butanol-pyridine-acide acétique- H₂O dans les proportions 15 - 10 - 3 - 12 (v/v)

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

La séparation électrophorétique est ensuite réalisée pendant 90 minutes sous une tension de 2.200 volts, dans un tampon de pH 3.6 : pyridine - acide acétique - H₂O : 1 : 10 : 289 (v/v).

L'appareil utilisé est un Electrophorator GILSON.

Un mélange d'acides aminés témoins - acide aspartique, tyrosine, arginine - permet de déterminer le comportement électrophorétique acide neutre ou basique des peptides.

TABLEAU VII

COMPOSITION DU GRADIENT POUR L'ELUTION DES PEPTIDES DE LA COLONNE DE CHROMOBEADS P

Numéro de la cellule	Tampon pyridine - (x) acide formique 0,1 <u>M</u> , pH 2,9	Tampons pyridine - acide formique pH 5,0		Tampon pyridine - acide acétique 2 <u>M</u> , pH 5,0
		0,5 <u>M</u>	1 <u>M</u>	
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

(x) La pyridine (RP Prolabo) est purifiée par distillation sur ninhydrine (1g/litre)

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme par coloration avec le réactif à la ninhydrine - cadmium (LIU et coll., 1965).

Les fractions hétérogènes sont purifiées par chromatographie ou électrophorèse préparative ou par les deux méthodes associées, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

Les peptides sont élués du papier avec de l'acide acétique à 10 p. 100, évaporés à sec et repris dans un volume déterminé d'acide acétique à 10 p. 100.

4) étude des peptides tryptiques

- composition en acides aminés

Les peptides sont hydrolysés pendant 24 heures à 110°C en tubes scellés sous vide, en milieu HCl 6 N et en présence d'une goutte de phénol à 1 p. cent pour éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

La composition en acides aminés est établie à l'aide d'un analyseur d'acides aminés BECKMAN type Multichrom A équipé d'un intégrateur INFOTRONICS C R S 210.

- détermination de l'extrémité N-terminale

L'acide aminé N-terminal est déterminé par dansylation en milieu bicarbonate de sodium 0.2 M selon la technique décrite par GRAY et HARTLEY (1963-a). Le peptide dansylé est hydrolysé par l'HCl 6 N, pendant 18 heures à 105 °C. Ce temps est réduit à 15 heures sous vide lorsque l'on est en présence de dansylamino-acides hydroxylés (sérine ou thréonine).

Les dansylamino-acides sont identifiés sur couche mince de gel de silice (Silicagel Merck - Ref 5721) (20 x 20 cm) :

- soit en chromatographie monodimensionnelle selon la technique de STEHELIN et DURANTON (1969) avec un seul système solvant :

benzène - pyridine - acide acétique : 80 : 20 : 2 (v/v)

La chromatographie est réalisée pendant 90 minutes.

- soit en chromatographie bidimensionnelle à angle droit selon la méthode préconisée par GROS et LABOUESSE (1969) :

Solvant I : benzène - pyridine - acide acétique

80 : 20 : 2 (v/v)

migration 90 minutes

Solvant II : toluène - 2 - Chloroéthanol - ammoniacque

30 : 50 : 20 (v/v)

la migration dans ce deuxième solvant est réalisée pendant 120 minutes

- dégradation des peptides par la méthode d'Edman

La schématisation des différentes étapes de la dégradation d'EDMAN (1956) est donnée dans le Tableau VIII. Après chaque cycle de dégradation, l'acide aminé peut être identifié :

- . directement sous forme de son dérivé PTH (phenylthiohydantolne de l'acide aminé

Nous avons utilisé pour l'identification des PTH la méthode décrite par COHEN SOLAL et BERNARD (1973). La microchromatographie est réalisée sur couche mince de gel de silice (Kieselgel 60 F 254) découpées aux dimensions de 63 x 63 mm.

Avant emploi, les plaques sont trempées dans une solution d'amidon soluble à 1 p. 100 et séchées à 80°C pendant 30 minutes.

La plaque est soumise à deux migrations successives :

- première migration dans le solvant V :

chloroforme - méthanol : 90 : 10 (v/v)

Cette migration est effectuée jusqu'à ce que le front du solvant atteigne 3,3 cm.

- Après séchage de la plaque, une deuxième migration est effectuée dans le même sens, en utilisant du chloroforme pur (solvant I)

Les PTH amino-acides sont révélés par vaporisation de la solution :

Azide de sodium à 10 p. 100 - Iode 0,1 N - H₂O 15 : 10 : 25 (v/v/v).

TABLEAU VIIISCHEMA DES ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN

Réaction de couplage avec le P.I.T.C. (phénylthiocyanate)

50°C 40 mn

Élimination de l'excès de P.I.T.C.

Cyclisation et coupure par l'acide trifluoro acétique (TFA)

50°C 7 mn

Formation de dérivés 2 - anilinothiazolinone

HCl 80°C 10 mn

Phénylthiohydantoïne de l'acide aminé

Extraction par l'acétate d'éthyle

Phase organique

Séparation des phénylthiohydantoïne -
Acides - aminés par chromatographie
sur couche mince de gel de silice :

(KIESELGEL 60 F 254)

COHEN SOLAL et BERNARD (1973)

- Solvant V

Chloroforme - méthanol 90:10 (v/v)

- Solvant I

Chloroforme

Phase aqueuse

- Phénylthiohydantoïne - arginine

- Phénylthiohydantoïne - histidine

Identification sur papier :

- Réaction de SAKAGUCHI ou réaction
à la phénanthrène-quinone

(détection de l'ARGININE)

- Réaction de PAULY

(détection de l'HISTIDINE)



. Après chaque cycle de dégradation d'Edman, la dansylation associée à la dégradation d'Edman, selon le protocole de GRAY et HARTLEY (1963 - b) permet d'identifier l'acide aminé en position N-terminale, dans le peptide résiduel.

. Enfin, dans certains cas douteux, on peut utiliser la méthode soustractive proposée par HIRS et coll., (1960) dans laquelle on réalise une composition en acides aminés du peptide résiduel après chaque cycle de dégradation.

- détermination de l'extrémité C-terminale

Lorsque la séquence en acides aminés des peptides trypsiques n'a pu être déterminée complètement par la dégradation d'EDMAN, nous avons effectué une hydrolyse cinétique du peptide par la carboxypeptidase B puis A.

L'hydrolyse est effectuée à 40°C, en milieu N - méthyl - morpholine 0.1 M, pH 8.0, avec un rapport enzyme/substrat de 1/50. Les acides aminés libérés sont identifiés à l'analyseur d'acides aminés.

3) Dégradation automatique d'EDMAN de l'histone H 2 B de thymus de Rat

L'appareil que nous avons utilisé est un séquenceur en phase liquide de type SOCOSI PS 100 (x).

La technique proposée, en 1967, par EDMAN et BEGG rend automatique la réaction de couplage de la protéine (ou du polypeptide) avec le phenylisothiocyanate (PITC) ainsi que la réaction de clivage qui entraîne la rupture de la liaison peptidique terminale et libère la thioazolinone formée.

Par contre, la conversion de la thioazolinone en PTH -aminoacide ainsi que l'identification du PTH restent manuelles.

Le principe de cet appareil est d'étaler un film très mince de protéine par centrifugation dans une coupelle cylindrique.

(x) La dégradation automatique d'Edman a été réalisée par les soins des Docteurs K. HAN et P. SAUTIERE que nous remercions vivement.

Les réactifs et les solvants entraînés sur la paroi de la coupelle, peuvent réagir avec la protéine, extraire les divers composés et être évacués par l'intermédiaire d'une vanne à 3 voies, soit vers le collecteur de fractions, s'il s'agit d'un produit de réaction extrait par un solvant, soit vers la poubelle s'il s'agit d'un solvant de lavage.

Dans le cas d'un réactif, le niveau de liquide ne doit pas dépasser la limite supérieure du dépôt ; dans le cas d'un solvant, il atteint la gorge située à la partie supérieure de la coupelle d'où il est évacué (Figure 6) (PLANCHON, 1973).

La protéine dissoute dans l'eau est déposée délicatement près du fond de la coupelle tandis que celle-ci tourne à 1500 t/minute. Elle est alors plaquée contre la paroi de la coupe sous l'effet de la force centrifuge.

Il est important que la protéine soit répartie régulièrement sur la paroi et qu'elle y adhère parfaitement. En effet, toute accumulation de produits en un point de la coupe tendrait à entraîner un décollement du film protéique et son élimination lors des étapes de mise sous vide. (HAN et coll., 1973).

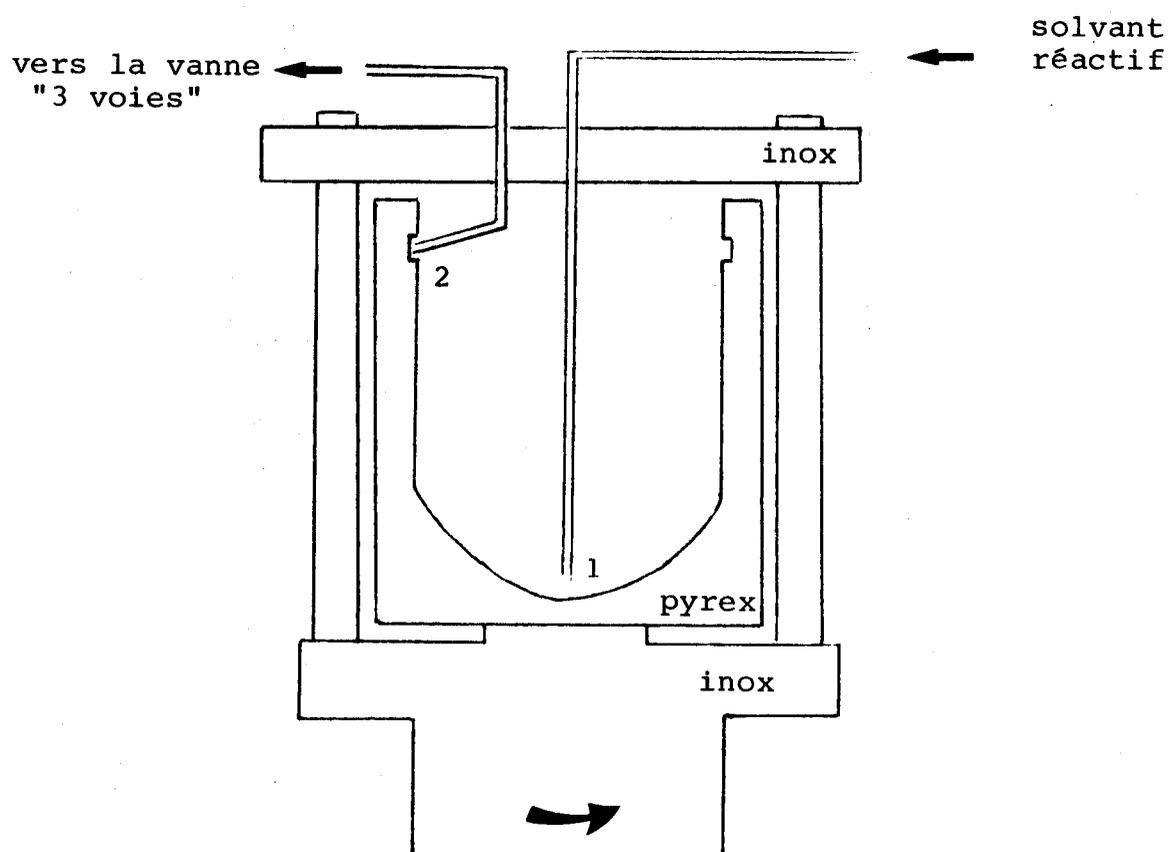
Les traces d'acide trifluoroacétique sont éliminées par lavage du film au chlorobutane .

La coupe cylindrique est mise progressivement sous vide pour dessécher la protéine et en atmosphère inerte par passage d'azote. Aussitôt après, le PITC et le quadrol (x) sont injectés au fond de la coupe et montent le long de la paroi sous l'effet de la force centrifuge.

Les hauteurs des liquides le long de la paroi sont proportionnels aux volumes introduits. En général, on s'arrange pour que le niveau du quadrol arrive très légèrement au-dessus de celui du dépôt.

L'étape de clivage est ensuite réalisée par l'injection d'acide heptafluorobutyrique.

(x) Quadrol : N, N, N', N' - tétrakis - (2 - hydroxypropyl) éthylène - diamine



1, 2 : tubes en or

Figure 6

Schéma de la coupe du séquenceur PS 100



Les thioazolinones obtenues sont recueillies dans les tubes d'un collecteur de fractions disposé dans une enceinte réfrigérée.

Tous les réactifs et les solvants utilisés sont "sequential grade" (x)

A ce stade, se termine l'automatisation de la dégradation récurrente d'EDMAN.

La thioazolinone obtenue à chaque cycle est transformée par une réaction de "réarrangements" en thiohydantolne beaucoup plus stable.

Cette opération de conversion ainsi que l'identification des PTH - amino - acides est réalisée comme décrit plus haut (Tableau VIII)

C) RESULTATS

1) coupure de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat par le bromure de cyanogène.

Les fragments obtenus après coupure de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat par le bromure de cyanogène, n'ont pu être complètement séparés, ni par chromatographie de tamisage moléculaire, ni par chromatographie d'échange ionique.

En effet, nous n'avons pu multiplier les essais de séparation des fragments obtenus car, à ce stade de notre travail, nous avons été informée que la souche qui permettait le développement de la tumeur par greffe, était morte.

Etant donné la faible quantité de matériel dont nous disposions alors, nous avons décidé d'entreprendre la structure de la protéine en réalisant l'hydrolyse trypsique sur le mélange.

(x) Pierce Chemicals (Rockford, Illinois, U.S.A.)

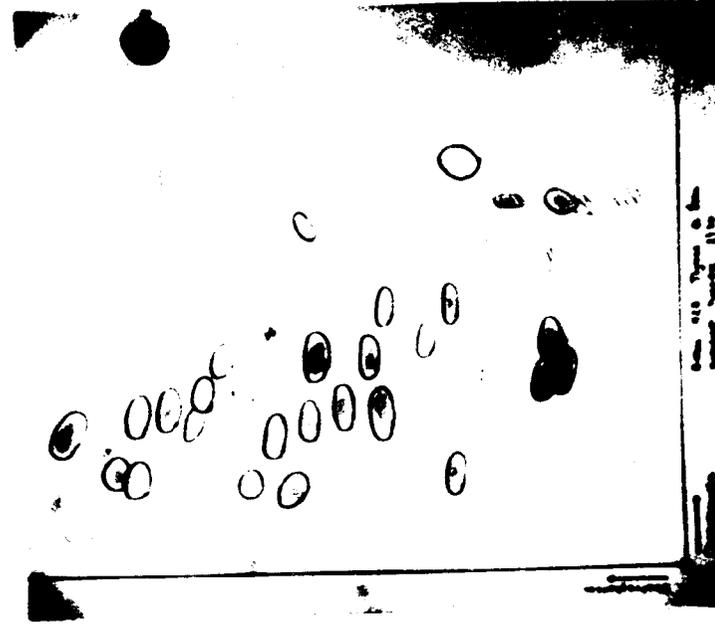
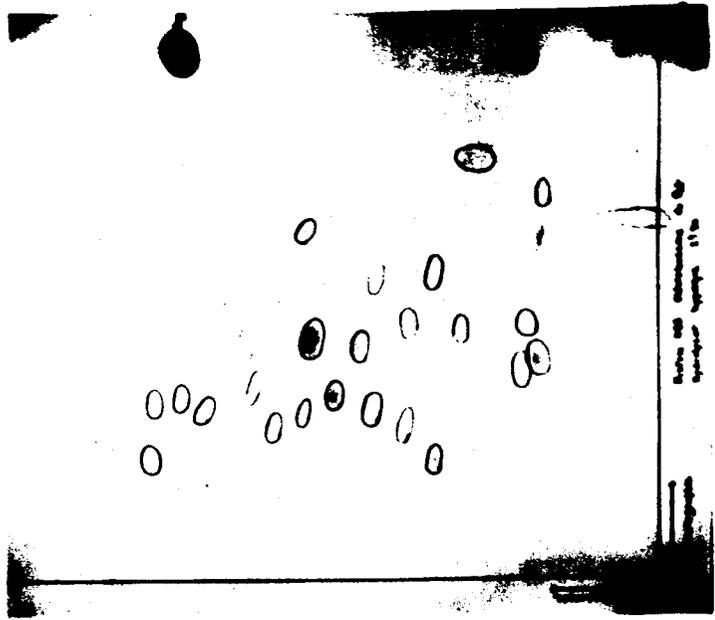


Figure 7

Cartes peptidiques des hydrolysats tryptiques de l'histone H2B isolée de

Chloroleucémie du Rat

Thymus de Rat

Thymus de Veau



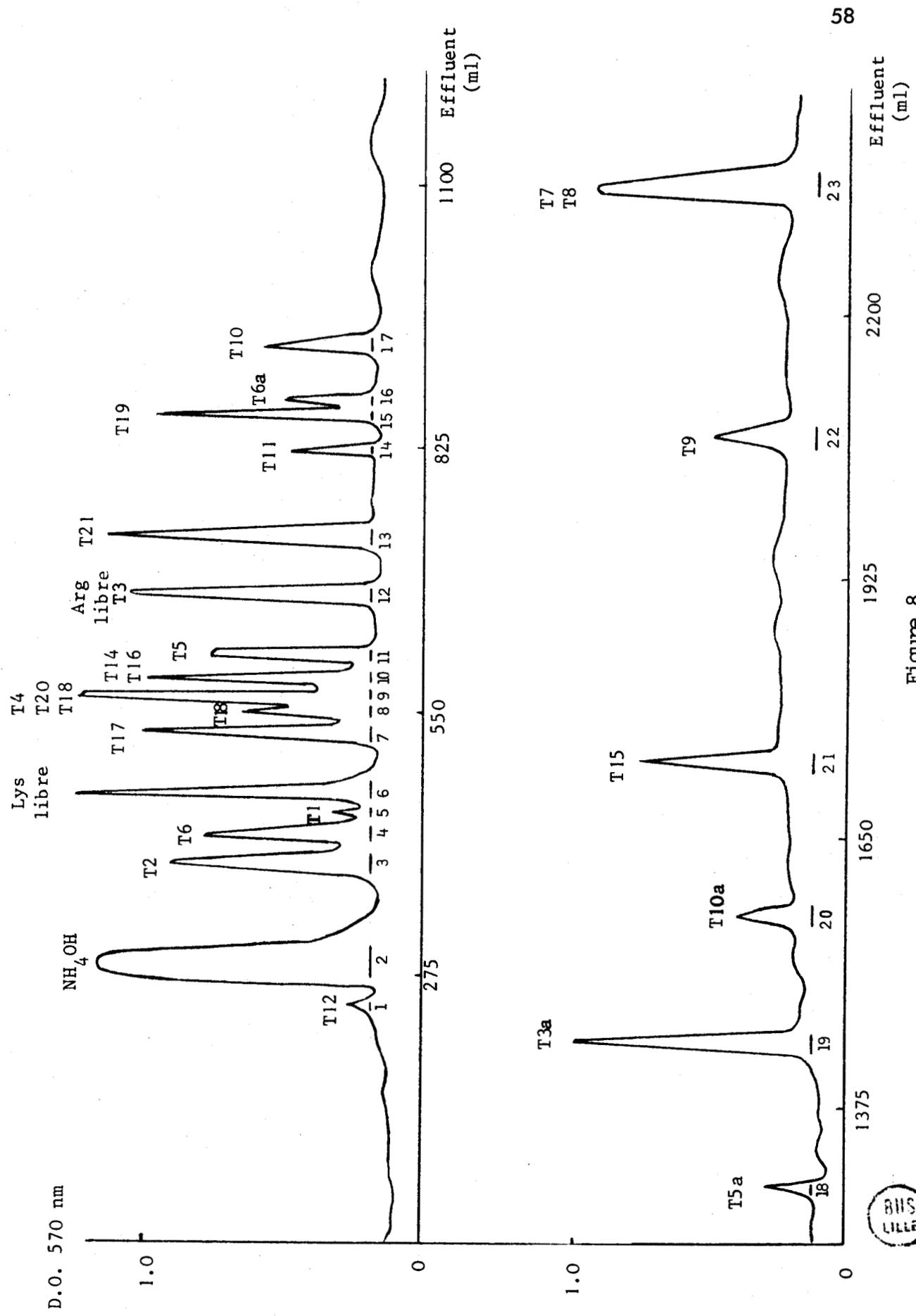


Figure 8

Diagramme d'élution des peptides de la fraction soluble de l'hydrolysate tryptique de l'histone H2B de thymus de Rat sur colonne de Chromobeads P.

Les peptides sont éventuellement purifiés par chromatographie dans le système solvant: butanol 1 - pyridine - acide acétique - eau : 5 : 10 : 3 : 12 v/v, en utilisant un papier Whatman 3 M M lavé pendant 48 heures avec de l'acide acétique à 10 p. 100.

L'histone H 2 B contient 20 résidus de lysine dont un en position C-terminale et 8 résidus d'arginine, ce qui représente 27 sites potentiels de coupure par la trypsine. Nous avons obtenu 23 fractions dont 2 sont hétérogènes. Deux autres fractions - les fractions 2 et 6 - correspondent respectivement à l'ammoniaque et à la lysine libre. De l'arginine libre est présente dans la fraction 12.

La composition en acides aminés et la séquence des peptides tryptiques de l'histone H 2 B de thymus de Rat sont respectivement présentées dans les tableaux IX et X. Des résultats identiques que nous n'avons pas introduits dans notre mémoire de thèse, ont été obtenus sur les peptides tryptiques de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat.

Peptide T - 1 (résidus 1 à 5)

Pro - Glu - Pro - Ala - Lys

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 5 avec un rendement de 10.8 p.100

Dansylamino - acide N-terminal : DNS - Pro

Ce peptide qui est le seul à posséder un résidu de proline en N-terminal, ne peut être situé dans la chaîne polypeptidique puisque la trypsine ne coupe pas les liaisons Lys - Pro ou Arg - Pro. D'autre part, nous avons identifié, par dansylation de la protéine, la proline en N-terminal. Nous en concluons que le peptide T - 1 est placé à l'extrémité N-terminale de la protéine. Ceci a été vérifié par la dégradation automatique d'Edman au séquenceur en phase liquide (page 76)

TABLEAU IX

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS

DE RAT (exprimées en rapports molaires) (x)

(x) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche

Acides aminés	T - 1	T - 2	T - 3	T - 3a	T - 4	T - 5	T - 5a	T - 6	T - 6a	T - 7
					T - 20					T - 8
acide aspartique								1.00 (1)	1.18 (1)	
Thréonine					1.03 (1)					
Sérine		0.83 (1)	0.91 (1)	1.22 (1)						
Acide glutamique	0.90 (1)					1.08 (1)	1.03 (1)			
Proline	1.84 (2)	1.98 (2)								
Glycine			1.08 (1)	1.33 (1)				1.26 (1)	1.45 (1)	
Alanine	1.02 (1)	1.88 (2)			1.13 (1)	0.92 (1)	1.07 (1)			
Valine					1.03 (1)					
Méthionine										
Isoleucine										
Leucine										
Tyrosine										
Phénylalanine										
Lysine	1.00 (1)	1.00 (1)	1.00 (1)	2.00 (2)	1.00 (1)	1.00 (1)	2.00 (2)	1.00 (1)	2.00 (2)	1.00 (1)
Histidine										
Arginine										1.00 (1)
Nombre de résidus	5	6	3	4	4	3	4	3	4	2

5211
5212

TABLEAU IX (suite)

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS DE RAT

(exprimées en rapports molaires) (x)

(x) les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche

(xx) le peptide T - 13 isolé de la fraction insoluble de l'hydrolysat trypsinique constitue le core hydrophobe de la protéine

Acides aminés	T - 9	T - 10	T - 10a	T - 11	T - 12	T - 13 (xx)	T - 14	T - 15	T - 16
Acide aspartique					0.93 (1)	3.02 (3)		1.15 (1)	
Thréonine					0.90 (1)				1.83 (2)
Sérine	0.82 (1)	1.40 (2)	1.46 (2)		1.56 (2)	1.00 (1)	0.97 (1)		1.92 (2)
Acide glutamique		1.00 (1)	1.27 (1)		0.95 (1)	1.32 (1)	1.09 (1)		
Proline					1.02 (1)				
Glycine					1.05 (1)	1.00 (1)	1.06 (1)		
Alanine						1.00 (1)	1.94 (2)	1.12 (1)	
Valine		1.90 (2)	1.82 (2)	0.91 (1)	0.93 (1)	1.13 (1)			
Méthionine						1.38 (2)			
Isoleucine					0.91 (1)	1.88 (2)	1.00 (1)		1.00 (1)
Leucine				0.93 (1)				0.75 (1)	
Tyrosine		2.68 (3)	2.36 (3)					0.58 (1)	
Phénylalanine						1.96 (2)			
Lysine	1.00 (1)	1.13 (1)	2.18 (2)	1.00 (1)	1.00 (1)			1.00 (1)	
Histidine					0.88 (1)			1.18 (1)	
Arginine	1.00 (1)					1.00 (1)			1.00 (1)
Nombre de résidus	3	9	10	3	11	15	7	6	6



TABLEAU IX (suite)

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS DE RAT

(exprimées en rapports molaires) (x)

(x) les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.

(xx) la différence entre le nombre total de résidus trouvés et le nombre de lysine et d'arginine présents dans la protéine correspond à la lysine libre et à l'arginine libre.

Acides aminés	T - 17	T - 18	T - 19	T - 21	nombre total de résidus	Histone H 2 B
Acide aspartique	.				6	6
Thréonine	0.95 (1)		1.00 (1)	0.95 (1)	8	8
Sérine			1.16 (1)	1.72 (2)	14	14
Acide glutamique	1.86 (2)	1.11 (1)	0.98 (1)		10	10
Proline		1.03 (1)			6	6
Glycine		1.27 (1)	1.20 (1)		7	7
Alanine	1.14 (1)	1.06 (1)	1.08 (1)		13	13
Valine	0.99 (1)		1.01 (1)		9	9
Méthionine					2	2
Isoleucine	0.94 (1)				6	6
Leucine		3.60 (4)			6	6
Tyrosine				0.67 (1)	5	5
Phénylalanine					2	2
Lysine		1.00 (1)	0.91 (1)	1.00 (1)	19 (xx)	20
Histidine			0.94 (1)		3	3
Arginine	1.00 (1)				6 (xx)	8
Nombre de résidus	7	9	8	5	122	125



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 d'Edman → placé au-dessus du résidu d'acide aminé
- Hydrolyse par les carboxypeptidases B, A ou C
← placé au dessous du résidu d'acide aminé

TABLEAU X

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS

DE RAT

T - 1	(résidus 1 à 5)		$\overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Glu}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Lys}$
T - 2	(résidus 6 à 11)		$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \text{Lys}$
T - 3	(résidus 13 à 15)		$\overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \text{Lys}$
T - 3 α	(résidus 12 à 15)		$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \text{Lys}$
T - 4	(résidus 17 à 20)	}	$\overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \text{Lys}$
T - 20	(résidus 117 à 120)		
T - 5	(résidus 21 à 23)		$\overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Gln}} - \text{Lys}$
T - 5 α	(résidus 21 à 24)		$\overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Gln} - \text{Lys} - \text{Lys}$
T - 6	(résidus 25 à 27)		$\overrightarrow{\text{Asp}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{Lys}$
T - 6 α	(résidus 24 à 27)		$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Asp}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{Lys}$
T - 7	(résidus 28 - 29)	}	$\overline{\text{Lys}} - \text{Arg}$
T - 8	(résidus 30 - 31)		
T - 9	(résidus 32 à 34)		$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \text{Lys}$
T - 10	(résidus 35 à 43)		$\overrightarrow{\text{Glu}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Tyr}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Tyr}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Tyr}} - \text{Lys}$



TABLEAU X (suite)

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS

DE RAT

T - 10 a (résidus 34 à 43)	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Glu}} - \text{Ser} - \text{Tyr} - \text{Ser} - \text{Val} - \text{Tyr} - \text{Val} - \text{Tyr} - \text{Lys}$
T - 11 (résidus 44 à 46)	$\overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \text{Lys}$
T - 12 (résidus 47 à 57)	$\begin{array}{c} \overrightarrow{\text{Gln}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{His}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Asp}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{Ile} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Lys}} \\ \leftarrow \text{T 10 - Th A} \quad \uparrow \text{Th} \quad \leftarrow \text{T 10 - Th B} \end{array}$
T - 13 (résidus 58 à 72)	$\overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Met}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Met}} - \overrightarrow{\text{Asn}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Phe}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Asn}} - \overrightarrow{\text{Asp}} - (\text{Ile, Phe, Glx}) - \text{Arg}$
T - 14 (résidus 73 à 79)	$\overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Glu}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \text{Arg}$
T - 15 (résidus 80 à 85)	$\overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - (\text{His}) - \overrightarrow{\text{Tyr}} - (\text{Asn}) - \text{Lys}$
T - 16 (résidus 87 à 92)	$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \text{Arg}$
T - 17 (résidus 93 à 99)	$\overrightarrow{\text{Glu}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Gln}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \text{Arg}$
T - 18 (résidus 100 à 108)	$\overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Glu}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Lys}}$
T - 19 (résidus 109 à 116)	$\overrightarrow{\text{His}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Glu}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{Thr} - \text{Lys}$
T - 21 (résidus 121 à 125)	$\overrightarrow{\text{Tyr}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \text{Lys}$



Dégradation d'Edman

4 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du PTH - aminoacide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

Peptide T - 2 (résidus 6 à 11)

Ser - Ala - Pro - Ala - Pro - Lys

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 3 avec un rendement de 17.3 p.100.

Dansylamino - acide NH₂ - terminal : D N S - Ser

Dégradation d'Edman

4 cycles de dégradation d'Edman associés à la dansylation du peptide résiduel ont permis d'établir la séquence du peptide.

Peptide T - 3 (résidus 13 à 15)

Gly - Ser - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 12 en même temps que de l'arginine libre dont il est séparé par chromatographie préparative.

Le peptide T - 3 est obtenu avec un rendement de 2 p. 100, ce qui montre que la liaison Lys - Gly du peptide T-3a n'est que très partiellement hydrolysée par la trypsine.

Dégradation d'Edman

2 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du PTH amino - acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence du peptide T - 3

Peptide T - 3 α (résidus 12 à 15)

Lys - Gly - Ser - Lys

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 19
avec un rendement de 13 p. 100

Dansylamino - acide NH₂ - terminal - DNS - Lys

Dégradation d'Edman

2 cycles de dégradation d'Edman en couplage avec
la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide T - 3 α .

Peptide T - 4 (résidus 17 à 20) et Peptide T - 20 (résidus 117 à 120)

Ala - Val - Thr - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 9 en même
temps que le peptide T - 18 dont il a été séparé par chromatographie préparative
sur papier.

il est obtenu avec un rendement de 28 p. 100. Ce
rendement élevé par rapport au rendement des autres peptides, peut s'expliquer
par la présence de deux séquences identiques (Ala - Val - Thr - Lys) dans la
protéine.

Dansylamino - acide NH₂ - terminal : DNS - Ala

Dégradation d'Edman

2 cycles de dégradation d'Edman associés à la
dansylation du peptide résiduel ont permis d'établir la séquence du peptide.

Peptide T - 5 (résidus 21 à 23)

Ala - Gln - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 11 avec un
rendement de 12,1 p. 100.

Dégradation d'Edman

La séquence du peptide T - 5 a été déterminée par 2 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe des PTH - aminoacides libérés.

Peptide T - 5 a (résidus 21 à 24)

Ala - Gln - Lys - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 18 avec un rendement de 2.6 p. 100. Ce faible rendement s'explique par la coupure de la liaison Lys - Lys par la trypsine avec un rendement de 82 p. 100 qui libère le peptide T - 5 Ala - Gln - Lys et de la lysine libre.

Dégradation d'Edman

2 cycles de dégradation d'Edman ont été effectués. L'identification directe du PTH - amino - acide libéré après le premier cycle a permis de déterminer un résidu d'alanine en position NH₂ - terminale.

La glutamine n'a pu être identifiée après le second cycle vraisemblablement par blocage de la dégradation récurrente dû à la cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

Peptide T - 6 (résidus 25 à 27)

Asp - Gly - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 4 avec un rendement de 4.3 p.100.

2 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du PTH - amino - acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence : Asp - Gly - Lys

Peptide T - 6 a (résidus 24 à 27)

Lys - Asp - Gly - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 16 avec un rendement de 2,6 p. cent.

Dégradation d'Edman

3 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du PTH-amino-acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence du peptide T - 6 a

Peptide T - 7 et T - 8 (résidus 28-29 et 30-31)

Lys - Arg

Dansylamino-acide N H₂ - terminal : di - DNS - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 23 avec un rendement de 6,5 p. cent. Ce rendement faible est dû au fait que la liaison Lys - Arg est partiellement coupée par la trypsine.

D'autre part, si on compare ce rendement avec celui du peptide T - 9 élué dans la même zone, ce peptide correspond à une séquence unique. Nous pouvons cependant postuler l'existence de deux séquences Lys - Arg par comparaison avec la séquence en acides aminés de l'histone H 2 B de thymus de Veau et d'après le nombre de résidus de lysine et d'arginine présents dans l'histone H 2 B de Rat.

Du reste, nous avons isolé, dans l'hydrolysate tryptique de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat, un peptide de composition : Lys 1.07 (1) ; Arg 1.93 (2) et dont la séquence Arg - Lys - Arg a été déterminée par dégradation d'Edman suivie de l'identification des P T H aminoacides libérés. En chromatographie sur colonne de chromobeads P le volume d'élution de ce peptide est de 2558 ml alors que celui du peptide Lys - Arg est de 2305 ml. Ce peptide correspond sans ambiguïté aux résidus 29-30 et 31 de la séquence en acides aminés de l'histone H 2 B.

Peptide T - 9 (résidus 32 à 34)

Ser - Arg - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 22 avec un rendement de 8,6 p. cent.

Dansylamino-acide N H₂ - terminal : D N S - SerDégradation d'Edman :

Un cycle de dégradation d'Edman associé à la dansylation du peptide résiduel a permis d'établir la séquence : Ser - Arg - Lys.

Nous n'avons pas retrouvé dans l'hydrolysat le peptide Ser - Arg

Peptide T - 10 (résidus 35 à 43)

Glu - Ser - Tyr - Ser - Val - Tyr - Val - Tyr - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 17 avec un rendement de 6 p. cent.

Dégradation d'Edman

8 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du P T H - amino-acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence du peptide T - 10.

Peptide T - 10.a (résidus 34 à 43)

Lys - Glu - Ser - Tyr - Ser - Val - Tyr - Val - Tyr - Lys

Ce peptide est retrouvé dans la fraction 20 avec un rendement de 2,8 p. cent

Dansylaminoacide N H₂ - terminal : di - D N S - Lys

Dégradation d'Edman

2 cycles de dégradation d'Edman nous ont permis de déterminer l'enchaînement Lys - Glu.

Le reste de la séquence a été déduit de l'étude structurale du peptide dérivé T - 10 obtenu avec un rendement plus élevé.

Peptide T - 11 (résidus 44 à 46)

Val - Leu - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 14 avec un rendement de 18,2 p. cent.

Dansylamino-acide N H₂ -terminal : DNS - Val

Dégradation d'Edman

Un cycle de dégradation d'Edman associé à la dansylation du peptide résiduel a permis d'établir la séquence de ce peptide.

Peptide T - 12 (résidus 47 à 57)

Glp - Val - His - Pro - Asp - Thr - Gly - Ile - Ser - Ser - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 1 avec un rendement de 10,4 p. cent. Nous le retrouvons également dans la fraction 2 où il est élué de la résine de chromobeads P en même temps que l'ammoniaque. Le rendement est alors de 3,4 p. cent.

Ce peptide est faiblement révélé par la réaction à la ninhydrine, vraisemblablement à cause de la cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

La dansylation ainsi que la dégradation d'Edman effectuées sur ce peptide n'ont apporté aucun résultat.

Nous avons alors soumis ce peptide à une hydrolyse enzymatique par la thermolysine : ce choix a été guidé par la présence de valine et d'isoleucine dans ce peptide.

L'hydrolyse a été réalisée pendant 1 heure à 40°C, en milieu bicarbonate d'ammonium 0.1 M pH 8.0 ; l'enzyme a été ajoutée à la concentration de 0,1 mg par Mole de peptide.

L'hydrolyse a été arrêtée en amenant le pH à 3,5 par addition d'une goutte d'acide formique.

Les peptides que nous avons obtenus ont été séparés par électrophorèse préparative sur papier. Nous les avons désignés par les lettres Th - A et Th - B en fonction de leur comportement plus ou moins anodique en électrophorèse.

Les deux peptides T - 12 Th - A et T - 12 Th - B que nous avons obtenus ont été séparés par électrophorèse préparative sur papier.

La composition en acides aminés de ces peptides est donnée dans le Tableau XI.

TABLEAU XI

	T - 12 Th - A	T - 12 Th - B
Acide aspartique	1.04 (1)	
Thréonine	0.93 (1)	
Sérine		1.87 (2)
Acide glutamique	1.03 (1)	
Proline	0.90 (1)	
Glycine		1.00 (1)
Valine	0.86 (1)	
Isoleucine		0.80 (1)
Histidine	1.02 (1)	
Lysine		1.00 (1)

Peptide T - 12 Th - A (résidus 47 à 52)

Glp, Val, His, Pro, Asp, Thr

La séquence de ce peptide n'a pas été déterminée.

La dégradation d'Edman effectuée sur ce peptide ne nous a apporté aucun résultat en raison de la cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

D'autre part, par action de la thermolysine sur le peptide T - 12, nous pensons hydrolyser la liaison Glp - Val et déterminer ensuite la séquence du peptide Val - His - Pro - Asp - Thr. Or, la liaison Glp - Val n'a pas été rompue par action de la thermolysine.

Peptide T - 12 Th - B (résidus 53 à 57)

Gly - Ile - Ser - Ser - Lys

Dansylamino-acide N H₂ - terminal : D N S - Gly

Carboxypeptidases B et A

L'hydrolyse du peptide par la carboxypeptidase B pendant 2 heures suivie de l'action de la carboxypeptidase A pendant 6 heures a permis de déterminer la séquence :

Ser - Ser - Lys

L'ensemble des résultats obtenus par dansylation du peptide et par action des carboxypeptidases B et A a permis d'établir la séquence :

Gly - Ile - Ser - Ser - Lys

Le résidu d'isoleucine a été placé par différence. Le peptide Gly - Ile - Ser - Ser - Lys résulte de l'hydrolyse d'une liaison Thr - Gly par la thermolysine. C'est un site de coupure inattendu, mais qui a déjà été observé par SUNG et DIXON (1970) et par SAUTIERE et coll., (1974)

Peptide T - 13 (résidus 58 à 72)

Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-(Ile, Phe, Glu)-Arg

Ce peptide a été identifié dans la fraction insoluble de l'hydrolysate tryptique de l'histone H 2 B.

Sur la carte peptidique de cette fraction solubilisée dans l'acide acétique à 30 p. cent, le peptide T - 13 apparaît sous forme de traînée. Il est légèrement contaminé par des peptides de la fraction soluble. Le peptide T - 13 a été purifié par chromatographie préparative suivie d'une électrophorèse préparative.

Dégradation d'Edman

11 cycles de dégradation d'Edman avec identification des P T H amino-acides ont permis d'établir la séquence :

Ala - Met - Gly - Ile - Met - Asn - Ser - Phe - Val - Asn - Asp

L'arginine est placée en position C-terminale en raison même de la spécificité de la trypsine. Le reste de la séquence n'a pu être déterminé.

Peptide T - 14 (résidus 73 à 79)

Ile - Ala - Gly - Glu - Ala - Ser - Arg

Ce peptide est obtenu dans la fraction 10 en même temps que le peptide T - 16 dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier.

Le peptide T - 14 est obtenu avec un rendement de 18.2 p. cent.

Dégradation d'Edman

6 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du P T H amino-acide libéré après chaque cycle ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

Peptide T - 15 (résidus 80 à 85)

Leu - Ala - (His) - Tyr - (Asn) - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 21 avec un rendement de 8.6 p. cent

Dégradation d'Edman

5 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du P T H amino-acide libéré ont été effectués. Deux remarques s'imposent : La première concerne le 3ème cycle de dégradation. Après ce cycle, la phase organique ne contenait aucun P T H amino-acide. La recherche de P T H -histidine, par la réaction de Pauly, dans la phase aqueuse s'est révélée négative. La seconde remarque concerne le 5ème cycle de dégradation : après ce cycle, nous n'avons pas identifié de P T H-Asn ou de P T H - Asp dans la phase organique.

Les résidus d'histidine et d'asparagine ont donc été placés dans la séquence du peptide T - 15 par comparaison avec la séquence en acides aminés de l'histone H 2 B de thymus de Veau.

La présence d'asparagine plutôt que d'acide aspartique dans le peptide T - 15 a été déduite du comportement très basique de ce peptide à la fois en chromatographie sur échangeur cationique et en électrophorèse sur papier à pH 3.6.

Peptide T - 16 (résidus 87 à 92)

Ser - Thr - Ile - Thr - Ser - Arg

Ce peptide est obtenu dans la fraction 10 en même temps que le peptide T - 14 dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier. Le peptide T - 16 est obtenu avec un rendement de 13.4 p. cent.

Dansylamino-acide N H₂ - terminal : D N S - Ser

Dégradation d'Edman

4 cycles de dégradation d'Edman associés à la méthode de dansylation du peptide résiduel ont permis d'établir la séquence de ce peptide

Peptide T - 17 (résidus 93 à 99)

Glu - Ile - Gln - Thr - Ala - Val - Arg

Ce peptide est obtenu dans la fraction 7 avec un rendement de 15.2 p. cent

Dégradation d'Edman

6 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du P T H-amino-acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence du peptide T - 17.

Peptide T - 18 (résidus 100 à 108)

Leu - Leu - Leu - Pro - Gly - Glu - Leu - Ala - Lys

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 8, avec un rendement de 4.3 p. cent. La fraction 8 constitue un épaulement de la fraction 9. Le peptide T - 18 est donc également présent dans la fraction 9 où il est accompagné des peptides T - 4 et T - 20. Les peptides T - 4, T - 20 et T - 18 ont été séparés par chromatographie préparative sur papier.

Le peptide T - 18 est obtenu, à partir de la fraction 9, avec un rendement de 8.6 p. cent.

Dégradation d'Edman

6 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du P T H-amino-acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence :

Leu - Leu - Leu - Pro - Gly - Glu

Hydrolyse par les carboxypeptidases B et A

L'étude cinétique de l'hydrolyse du peptide T - 18 par les carboxypeptidases B et A a permis d'établir la séquence C-terminale suivante : Leu - Ala - Lys

L'ensemble des résultats fournis par la dégradation d'Edman et par l'hydrolyse du peptide par les carboxypeptidases B et A conduit à la séquence :

Leu - Leu - Leu - Pro - Gly - Glu - Leu - Ala - Lys

Peptide T - 19 (résidus 109 à 116)

His - Ala - Val - Ser - Glu - Gly - Thr - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 15 avec un rendement de 6.9 p. cent.

Dégradation d'Edman

6 cycles de dégradation d'Edman avec identification directe du P T H amino-acide libéré après chaque cycle, ont permis d'établir la séquence :

His - Ala - Val - Ser - Glu - Gly

La position C-terminale de la lysine découle de la spécificité de la trypsine ; le résidu de thréonine a été placé par différence.

Peptide T - 21 (résidus 121 à 125)

Tyr - Thr - Ser - Ser - Lys

Ce peptide est obtenu dans la fraction 13 avec un rendement de 12.1 p. cent

Dansylamino-acide N H₂ - terminal : D N S - TyrDégradation d'Edman :

3 cycles de dégradation d'Edman associés à la dansylation du peptide résiduel, ont permis d'établir la séquence du peptide T - 21

3) Détermination de l'extrémité N-terminale de l'histone H 2 B de thymus de Rat par dégradation automatique d'Edman

Nous avons soumis l'histone H 2 B de thymus de Rat à la dégradation automatique d'Edman dans un double but :

Notre premier objectif était la détermination de la séquence N-terminale de la protéine. A cette époque, le peptide tryptique N-terminal (T - 1) : Pro - Glu - Pro - Ala - Lys n'avait pas encore été identifié dans l'hydrolysate tryptique de la protéine. En effet, notre système de repérage automatique des peptides dans l'éluat d'une colonne ne comporte qu'un colorimètre réglé à 570 nm pour mesurer la densité optique de l'éluat après réaction avec la ninhydrine. Dans ce système, les peptides possédant une proline en position N-terminale présentent donc à cette longueur d'onde, une réactivité faible. D'autre part, cette expérience devait nous permettre de rechercher les conditions opératoires idéales pour soumettre d'autres histones H 2 B à la dégradation automatique d'Edman. :

En effet, les conditions expérimentales qui nous ont été proposées, se sont révélées mal adaptées à la dégradation automatique de l'histone H 2 B.

En effet, l'acide trifluoroacétique utilisé pour dissoudre la protéine, la dissout en fait très mal et pourrait être remplacé avantageusement par l'acide formique à 50 p. cent.

Par ailleurs, en raison de la richesse en lysine de la protéine, une température de 56°C serait préférable à une température de 50°C pour la réaction de couplage de la protéine avec le phenylisothiocyanate (P I T C) ; pour cette même raison, le quadrol utilisé pour le tampon de couplage doit être remplacé par des dérivés volatils tels que la diméthylbenzylamine (D M B A) ou la diméthylaminopropyne (D M A P)

Ces expériences nous ont permis cependant de déterminer la séquence des 12 premiers résidus et d'aligner les peptides T - 1 et

T - 2 : ₁

10

HN - Pro - Glu - Pro - Ala - Lys - Ser - Ala - Pro - Ala - Pro - Lys - Lys

4) Discussion

La composition en acides aminés de l'histone H 2 B indique 28 sites potentiels de clivage pour la trypsine (présence de 20 lysine et 8 arginine), ce qui devrait donner 28 peptides tryptiques puisque un résidu de lysine est placé à l'extrémité C-terminale de la protéine. En fait, nous avons retrouvé 22 peptides dans la fraction soluble de l'hydrolysate tryptique et un peptide dans la fraction insoluble.

Le déficit n'est qu'apparent et s'explique à la fois par la présence d'enchaînements Lys - Lys et Arg - Lys qui libèrent de la lysine (fraction 6), d'enchaînements Lys - Arg qui libèrent de l'arginine, et par la présence de 2 séquences identiques : Ala - Val - Thr - Lys correspondant aux résidus 17 à 20 et 117 à 120.

Nous avons déterminé la séquence en acides aminés des peptides tryptiques de l'histone H 2 B de thymus de Rat (Tableau X, pages 63 et 64)

Des résultats identiques ont été obtenus avec les peptides tryptiques de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat

L'étude des peptides tryptiques constitue la base des études comparatives réalisées sur des histones homologues isolées de différents tissus. Cette étude confirme l'identité de la structure primaire de l'histone H 2 B de Rat (thymus et chloroleucémie) avec celle de l'histone H 2 B de Veau (Thymus)

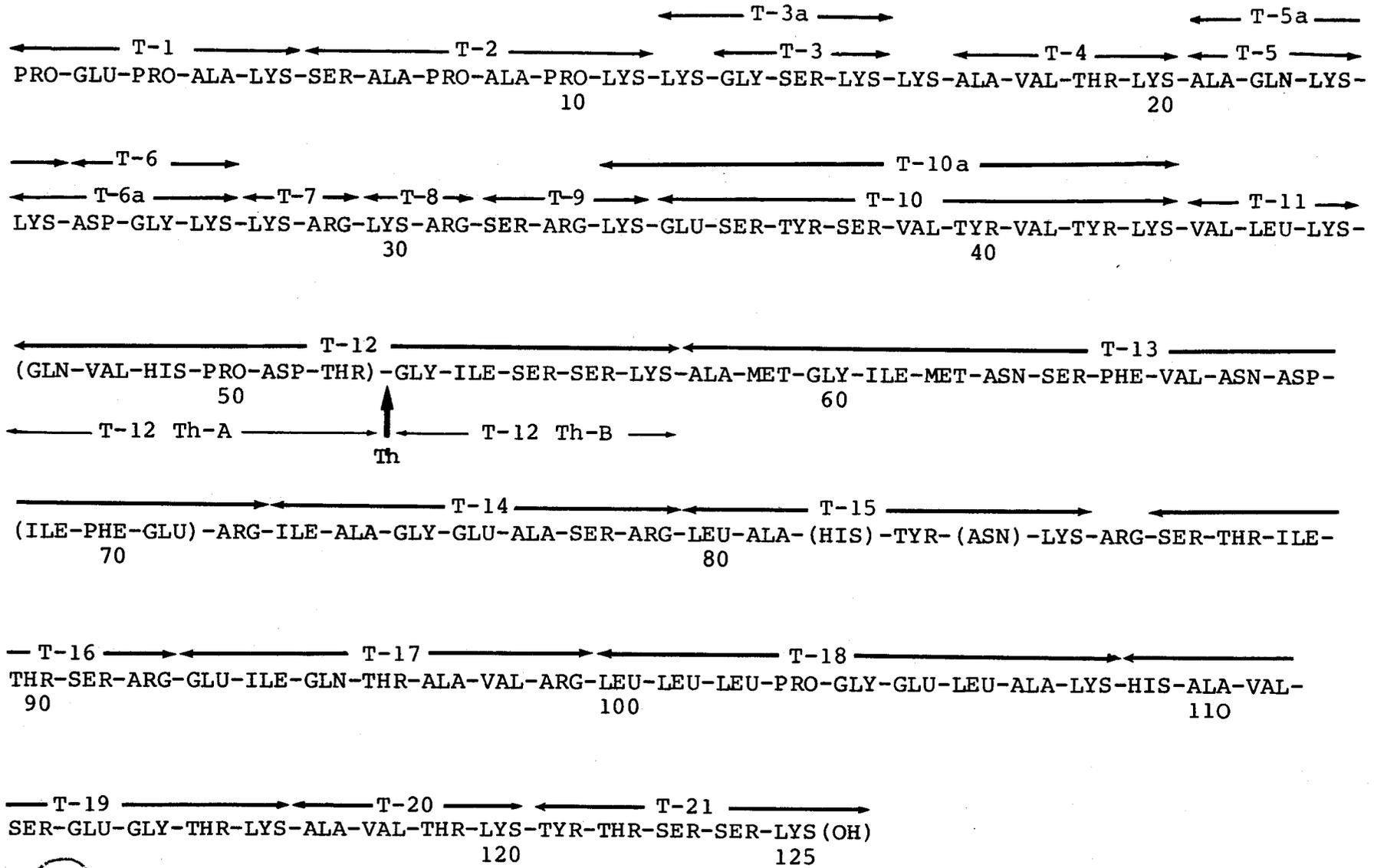
Les peptides ont été replacés dans la séquence de la protéine par comparaison avec la séquence de l'histone homologue de thymus de Veau établie par IWAJ et coll., (1970) (Tableau XII)

La séquence en acides aminés de l'histone H 2 B est caractérisée par :

- un résidu de proline en position N-terminale
- un résidu de lysine en position C-terminale
- la présence d'un centre basique : Lys - Lys - Arg - Lys - Lys (résidus 27 à 31) situé dans la région N-terminale de la protéine

TABLEAU XII

Structure primaire de l'histone H2B de thymus de Rat



- la présence d'une zone hydrophobe (résidus 31 à 102) où sont localisés ,
comme nous le verrons plus loin, les sites d'interaction histone - histone .
- la prédominance de résidus basiques dans la région N-terminale (30 résidus)
qui renferme 10 charges positives nettes . Cette région est la zone privilégiée
d'interaction de l'histone avec le D N A .

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons déterminé les sites de phosphorylation in vitro de l'histone H 2 B de thymus de Rat, par une kinase extraite du pancréas de Rat.

Pour localiser les sites de phosphorylation nous avons utilisé une méthodologie identique à celle qui nous a permis de déterminer la séquence en acides aminés de l'histone H2 B : hydrolyse trypsique sur chromo-beads P, repérage des fractions radioactives et séquence en acides aminés .

CHAPITRE III

DETERMINATION DES SITES DE PHOSPHORYLATION IN VITRO DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS DE RAT PAR UNE KINASE PANCREATIQUE

A) INTRODUCTION

Le rôle des modifications chimiques auxquelles sont soumises les histones après leur synthèse, n'est pas encore définitivement établi mais il semble qu'en modifiant la charge des histones, par l'intermédiaire d'un mécanisme enzymatique, ces réactions puissent moduler les interactions histones - D N A et affecter ainsi la structure de la chromatine.

L'importance attribuée à ces modifications nous a conduite à étudier les sites de phosphorylation in vitro de l'histone H 2 B de thymus de Rat.

Suivant le type d'enzyme utilisé, la capacité des histones à accepter le groupe phosphate pourra être modifiée :

- influence de l'enzyme utilisé :

Différents types de protéines-kinases catalysent la phosphorylation des résidus de sérine ou de thréonine dans les histones.

Ces enzymes qui transfèrent le phosphate en position γ de l' A T P sur la fonction alcool de la sérine ou éventuellement de la thréonine, sont stimulés ou non par l' A M P cyclique. Ils peuvent être activés aussi par le G M P cyclique.

Les travaux de KUO et GREENGARD (1970) montrent que les protéines kinases dépendantes de l' A M P cyclique ou du G M P cyclique utilisent les histones comme substrat plutôt que d'autres protéines telles que protamines, caséine, sérum albumine bovine...

Les protéines kinases ont été isolées d'un grand nombre de tissus de Vertébrés, d'Invertébrés et de Bactéries.

Il semble que l'origine et la nature de l'enzyme (dépendant ou indépendant de nucléotides cycliques) soient l'une des causes des variations observées dans les sites de phosphorylation des protéines, *in vitro*.

B) METHODES

1) Phosphorylation *in vitro* de l'histone H 2 B de thymus de Rat par une kinase dépendante de l'A M P cyclique, isolée du pancréas de Rat (x)

a) préparation de l'enzyme

La préparation de l'enzyme a été décrite par CENATIEMPO et coll., (1975). Nous en présentons les grandes lignes.

Le pancréas de Rat est homogénéisé dans une solution de sucrose 0.3 M contenant 6 m M de β -mercaptoéthanol et 1 m M de benzamidine. Après centrifugation à 105.000 g pendant 180 minutes, 50 p. cent de l'activité de l'enzyme est retrouvée dans le surnageant, l'extraction du sédiment obtenu par une solution de NaCl 0.2 M contenant 0.2 M de bicarbonate de sodium à pH 7.8 et 1 m M de benzamidine permet de retrouver toute l'activité de l'enzyme.

La sous-unité catalytique de la protéine kinase ainsi obtenue, dépendant de l'A M P cyclique est purifiée en une seule étape par chromatographie sur D E A E cellulose.

(x) La préparation de l'enzyme et la phosphorylation de l'histone H 2 B de thymus de Rat ont été réalisées par le Professeur MARCHIS-MOUREN et ses collaborateurs (Institut de Chimie Biologique, Université d'Aix-Marseille).

Nous les remercions vivement

b) phosphorylation de l'histone H 2 B

L'histone H 2 B ($1,5 \mu\text{M}$) est phosphorylée par l' $[\gamma -^{32}\text{P}] \text{ATP}$ ($4 \cdot 10^{-4} \text{M}$), en présence d'une kinase extraite du pancréas de Rat ($100 \mu\text{g}$) et d'AMP cyclique ($10 \mu\text{M}$). La réaction est effectuée à 30°C pendant 24 heures.

2) hydrolyse trypsique et repérage des peptides marqués au ^{32}P

L'hydrolyse trypsique a été effectuée dans un tampon N-méthylmorpholine $0,1 \text{M}$, de pH 8.0 : ce tampon a l'avantage d'être volatil. D'autre part, il évite la présence de quantité excessive d'ammoniac qui masque la séparation des peptides dans la zone d'éluion des peptides de caractère acide lors du repérage à la ninhydrine,

21 mg de l'histone H 2 B marqués au ^{32}P sont dissous dans 2,5 ml de tampon. Le rapport enzyme / substrat est de 1 / 50. La réaction est réalisée à 37°C pendant 150 minutes. L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu en amenant le pH à 2.0 par addition d'acide formique pur.

Une électrochromatographie est réalisée sur $50 \mu\text{l}$ de l'hydrolysate dans les conditions décrites dans le Chapitre II/ Méthodes)

Après séchage, la carte peptidique est soumise à une autoradiographie pendant 48 heures (film Kodirex, Kodak $45 \times 45 \text{cm}$), puis les peptides sont révélés par le réactif à la ninhydrine-cadmium

Les peptides trypsiques de l'hydrolysate sont séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de chromobeads P. Les fractions peptidiques sont repérées dans l'éluat par la réaction à la ninhydrine, à l'aide d'un autoanalyseur TECHNICON

La radioactivité est mesurée sur les tubes correspondant à chaque sommet de pic :

0,5 ml de solution peptidique sont ajoutés à 10 ml de solution de BRAY (x)
Le mélange est passé au compteur à scintillation liquide "Nuclear Chicago"

Les fractions peptidiques radioactives sont repérées et une carte peptidique suivie d'une autoradiographie est effectuée sur chacune d'entre elle.

3) composition en acides aminés et détermination des sites de phosphorylation

La composition en acides aminés des peptides est déterminée, après hydrolyse en milieu HCl 6 N , pendant 24 heures à 110°C, en tubes scellés sous vide : ces conditions d'hydrolyse sont suffisantes pour obtenir une coupure complète des liaisons ester sérine - O - phosphate et thréonine - O - phosphate (BYLUND et HUANG , 1976)

C) RESULTATS

Nous présentons dans la Figure 9 la carte peptidique de l'hydrolysats trypsique de l'histone H 2 B phosphorylée de thymus de Rat. L'autoradiographie de cette carte révèle la présence de 4 taches radioactives, correspondant aux peptides marqués. Trois de ces peptides ont un comportement neutre ; le quatrième, migrant presque au niveau de l'arginine est de caractère basique.

(x) Liquide de scintillation : BRAY

naphtalène	60 g
PPO (1)	4 g
POPOP (2)	0,2 g
éthylène	20 ml
Méthanol	100 ml
Dioxanne Q.S.P	1 l

(1) PPO 2,5 diphenyloxazol

(2) POPOP 2,2' - - phenylène - bis(5 - phenyloxazol)

Figure 9

Carte peptidique de l'hydrolysate trypsique de
l'histone H 2 B phosphorylée de thymus de Rat.

La chromatographie est réalisée pendant 18 heures dans le système :

butanol - Pyridine - Acide acétique - Eau : 15 : 10 : 3 : 12 (v/v)

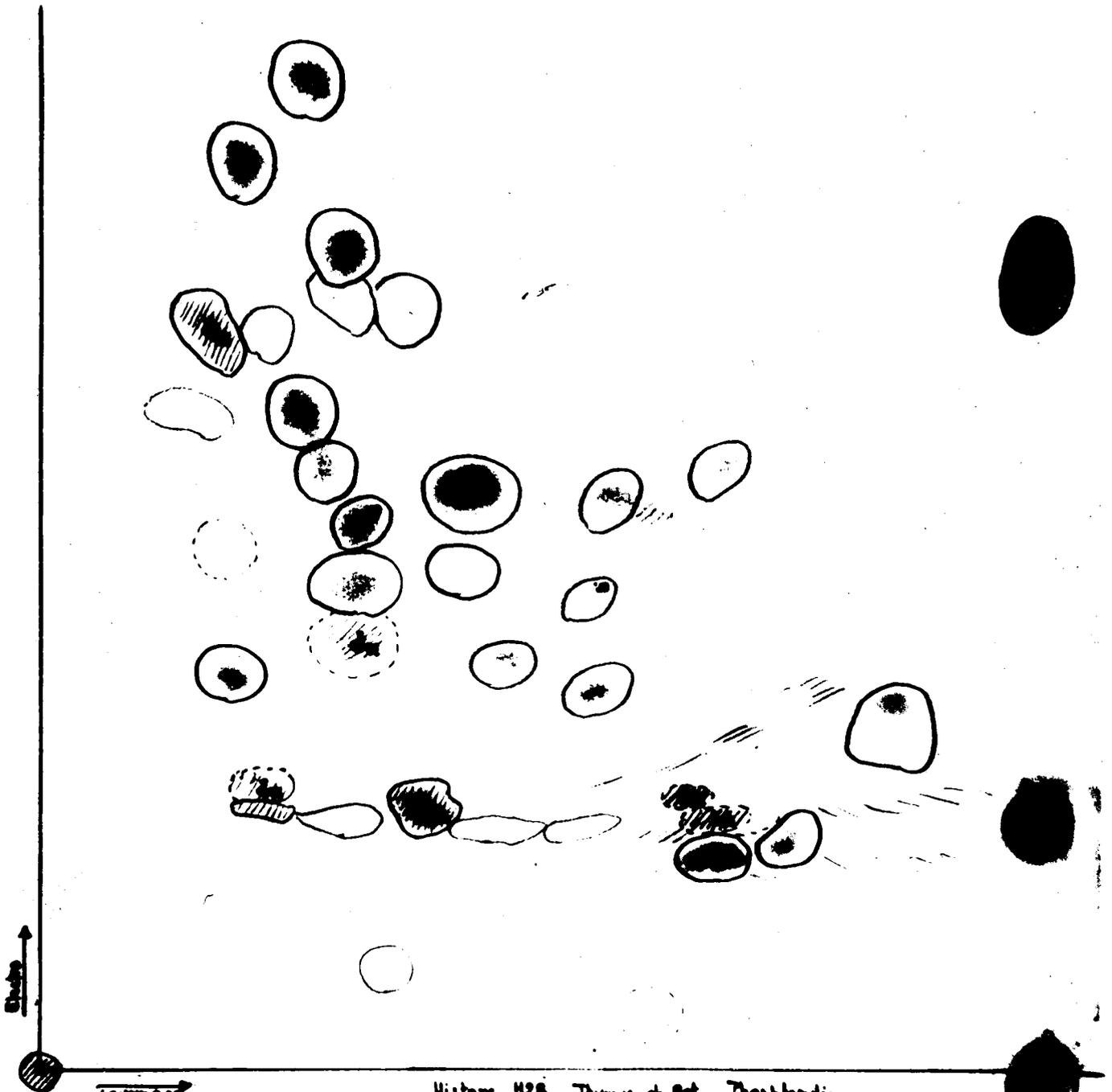
L'électrophorèse est réalisée pendant 90 minutes sous 2200 volts dans le tampon :

pyridine - acide acétique - eau : 1 : 10 : 289 (v/v) de pH 3.6 . L'acide aspartique, la tyrosine, l'arginine sont déposés comme marqueurs de migration électrophorétique .

Les peptides sont révélés par le réactif à la ninhydrine - cadmium .

Les zones hachurées correspondent aux peptides
marqués au ³²P.





microns

Histone 425 Thymus de Rat Thioflavine
Hydrolysat trypsinique 150 min 170177

LANS
LILLE

Dans les fractions peptidiques éluées de la colonne de Chromobeads P, nous avons détecté la présence de 5 pics radioactifs au compteur à scintillation liquide.

A l'exception de ces fractions dont le volume d'élution de la résine Chromobeads P est forcément modifié par la présence d'un groupe phosphate, le diagramme d'élution des peptides tryptiques de l'histone H 2 B phosphorylée (Figure 10 - A) est semblable à celui obtenu avec les peptides tryptiques de l'histone H 2 B non phosphorylée (Figure 10 - B).

Pour ne pas surcharger la figure et faciliter la comparaison de ces deux diagrammes, nous avons représenté simplement les peptides dont le comportement chromatographique était différent.

Les fractions 1, 2, 4, 7 et 8 sont radioactives, (Figure 10 - A).

La carte peptidique suivie de l'auto-radiographie effectuée sur chaque pic radioactif nous a montré que chaque fraction contenait un seul peptide que nous avons localisé sur l'auto-radiographie et sur la carte peptidique de l'hydrolysate tryptique global.

La composition en acides aminés des peptides tryptiques de l'histone H 2 B de thymus de Rat marqués au ^{32}P est donnée dans le Tableau XIII.

Les peptides sont numérotés d'après leur position dans la séquence comme nous l'avons fait pour l'hydrolysate tryptique de l'histone non phosphorylée.

La fraction 1, fortement radioactive, correspond vraisemblablement à l'excès de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ ou à du phosphate ^{32}P .

La fraction 2 correspond au peptide T - 16 phosphorylé qui a pour séquence :

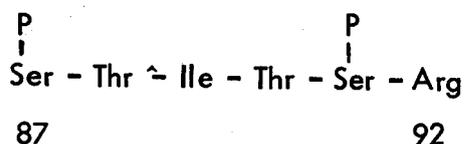


TABLEAU XIIICOMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDESTRYPSIQUES MARQUES AU ³²P

	T - 8 a	T - 9 a	T - 10	T - 16
Thréonine				1.68 (2)
Sérine	0.88 (1)	0.68 (1)	1.93 (2)	2.01 (2)
Acide glutamique			1.18 (1)	
Valine			1.90 (2))	
Isoleucine				1.00 (1)
Tyrosine			2.68 (3)	
Lysine	0.95 (1)		1.00 (1)	
Arginine	2.00 (2)	1.00 (1)		1.00 (1)

Les résultats sont exprimés en rapports molaires par rapport à la lysine ou à l'arginine.

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



Dans l'hydrolysate trypsique de l'histone H 2 B non phosphorylée, nous avons obtenu, outre le peptide T - 10, un peptide T - 10 a de structure : Lys-Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys

Ce peptide T - 10 a résultait d'une hydrolyse incomplète de la liaison Lys - Glu (34-35) par la trypsine. Cette hydrolyse incomplète probablement due à la présence d'acide glutamique au voisinage de la lysine (SAUTIERE et coll., 1974) n'a pas été observée au cours de l'hydrolyse trypsique de la protéine phosphorylée.

La fraction 7 correspond au peptide T - 9 a :

$$\begin{array}{c} \text{P} \\ | \\ \text{Ser} - \text{Arg} \\ 32 \end{array}$$

La fraction 8 renferme uniquement le peptide T - 8 a dont la structure est la

suivante :

$$\begin{array}{c} \text{P} \\ | \\ \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Ser} - \text{Arg} \\ 30 \qquad \qquad \qquad 33 \end{array}$$

2 cycles de dégradation d'Edman suivis de l'identification des P T H amino-acides libérées nous ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

Ce peptide représente une séquence unique dans la séquence en acides aminés de l'histone H 2 B

La liaison peptidique Arg - Ser semble partiellement protégée de l'action de la trypsine par la présence du groupement phosphate sur le résidu de sérine. D'ailleurs, dans l'hydrolysate trypsique de l'histone H 2 B non phosphorylée, nous n'avons pas retrouvé le peptide Lys - Arg - Ser - Arg ni le peptide Ser - Arg ; par contre nous avons identifié les peptides Lys - Arg et Ser - Arg - Lys.

Les peptides T - 8 a et T - 9 a renferment ensemble 65,8 p. cent de la radioactivité totale. La sérine 32 apparaît donc comme un site majeur de phosphorylation dans l'histone H 2 B

Nous avons présenté dans le Tableau XIV les différents sites de phosphorylation, *in vitro* que nous avons identifiés dans l'histone H 2 B de thymus de Rat.

TABLEAU XIV

SITES DE PHOSPHORYLATION DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS
DE RAT

Résidu	Peptide	Séquence	Radioactivité
Sérine 32	T - 8 a	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{Lys-Arg-Ser-Arg} \\ 32 \end{array}$	65,8 p.100
	T - 9 a	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{Ser-Arg} \\ 32 \end{array}$	
Sérine 36	T - 10	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys} \\ 36 \end{array}$	26.6 p.100
Sérines 87 et 91	T - 16	$\begin{array}{c} \text{P} \qquad \qquad \qquad \text{P} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg} \\ 87 \qquad \qquad \qquad 91 \end{array}$	7.5 p.100



D) CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus sur la phosphorylation de l'histone H 2 B de thymus de Rat associés aux résultats antérieurs d'autres auteurs, nous permettent de tirer quelques conclusions sur le mécanisme complexe de la phosphorylation :

1) les sites de phosphorylation d'une histone sont différents suivant l'origine tissulaire ou d'espèce de la protéine kinase

En utilisant une protéine kinase indépendante de l'AMP cyclique, isolée des lymphocytes d'amygdale humain, FARAGO et coll., (1975) ont observé 4 peptides également phosphorylés dans l'hydrolysat trypsique de l'histone H 2 B de thymus de Veau.

Avec une protéine kinase, dépendante de l'AMP cyclique et de même origine, on observe un seul site de phosphorylation localisé dans le peptide :

35	43
Glu - Ser - Tyr - Ser - Val - Tyr - Val - Tyr - Lys	

La phosphorylation de l'histone H 2 B de thymus de Veau, en présence d'une kinase dépendante de l'AMP cyclique isolée du cerveau de Porc, s'effectue au niveau des résidus de sérine 14 et 36 (SHLYAPNIKOV et coll., 1975)

Avec une kinase, dépendante de l'AMP cyclique, isolée du Ver à soie, HASHIMOTO et coll. (1975) ont phosphorylé les résidus de sérine 32 et 36.

En utilisant une kinase, dépendante de l'AMP cyclique, isolée du pancréas de Rat (MANGEAT et coll., 1977), nous avons obtenu les mêmes résultats : nous avons retrouvé plus de 92 p. cent de la radioactivité totale sur ces 2 résidus.

La sérine 36 semble être un site commun de phosphorylation pour de nombreuses kinases: kinase de lymphocyte d'amygdale humain (FARAGO et coll., 1975) ; kinase de Ver à soie (HASHIMOTO et coll., 1975); kinase de Cerveau de Porc (SHLYAPNIKOV et coll., 1975) ; kinase de pancréas de Rat (MANGEAT et coll., 1977).

Par contre, la phosphorylation des résidus de sérine en position 87 et 91 dans l'histone H 2 B, semble spécifique de la protéine kinase pancréatique de Rat de même que la phosphorylation du résidu de sérine 14 semble spécifique de la kinase de cerveau de Porc.

La phosphorylation des résidus de sérine 87 et 91 de l'histone H 2 B de thymus de Rat constitue des sites mineurs de phosphorylation puisqu'ils ne représentent chacun que 4 p. cent de la radioactivité totale.

2) Localisation des sites de phosphorylation

Quelle que soit la protéine kinase utilisée, les sites de phosphorylation sont souvent situés dans des centres basiques.

Généralement les résidus de sérine phosphorylés par une protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique sont situés dans une séquence X - Y - Ser où X est la lysine ou l'arginine, Y pouvant être un résidu acide, basique ou neutre (SHLYAPNIKOV et coll., 1975).

Ceci est particulièrement vérifié dans le cas de l'histone H 2 B de thymus de Rat (Tableau XV). Seul le résidu de sérine en position 91 n'est pas situé dans ce type de séquence. Il est lié néanmoins par son extrémité C-terminale à un résidu d'arginine.

Selon SHLYAPNIKOV et coll., (1975), la spécificité réelle de la protéine kinase serait en fait probablement liée à l'environnement des résidus de sérine dans la structure secondaire de la molécule.

TABLEAU XV

ENVIRONNEMENT DES SITES DE PHOSPHORYLATION DANS
LES HISTONES

Histone H 1	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Lys} - \text{Ala} - \text{Ser} - \\ 37 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Ser} - \text{Gly} - \text{Ser} - \\ 106 \end{array}$
Histone H 5	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Thr} - \text{Glu} - \text{Ser} - \\ 3 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Val} - \text{Leu} - \text{Ser} - \\ 7 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Ser} - \\ 104 \end{array}$
Histone H 2 B	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Ser} - \\ 32 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Lys} - \text{Glu} - \text{Ser} - \\ 36 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Ser} - \\ 87 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Ile} - \text{Thr} - \text{Ser} - \\ 91 \end{array}$
Histone H 2 A	$\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ \text{N} - \text{Ac} - \text{Ser} - \text{Gly} - \text{Arg} - \\ 1 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{P} \\ \\ - \text{Arg} - \text{Ser} - \text{Ser} - \\ 19 \end{array}$



Toutefois, dans l'histone H 5, spécifique des réticulocytes et des érythrocytes nucléés, l'environnement des sites de phosphorylation ne répond pas de façon aussi nette à la séquence X - Y - Ser proposée par SHLYAPNIKOV puisque 2 sites de phosphorylation sur 3 ne sont pas localisés près d'un résidu basique.

Depuis les travaux de KLEINSMITH et coll., (1966) et d'ORD et STOCKEN (1966) qui ont mis en évidence l'incorporation de phosphate dans les histones, la phosphorylation de ces protéines a été étudiée dans de nombreux tissus et à des moments précis du cycle cellulaire.

En particulier, l'histone H 1 semble être le meilleur substrat pour les kinases :

Deux sites de phosphorylation faisant intervenir des kinases spécifiques ont été déterminés dans l'histone H 1 de foie de Rat (LANGAN, 1971). Le premier site de phosphorylation est localisé sur le résidu de sérine en position 37 : cette phosphorylation est stimulée par le glucagon et nécessite la présence d'A M P cyclique. Elle est limitée à 1 p. cent des molécules d'histone H 1. Cette phosphorylation limitée in vivo ne peut être expliquée pour l'instant, mais elle pourrait constituer une réponse sélective d'une fraction de la chromatine à une stimulation hormonale.

Ce site de phosphorylation dans l'histone H 1 de foie de Rat n'est pas retrouvé dans toutes les sous-fractions de l'histone H 1 de thymus de Lapin où, dans la sous-fraction R T L - 3, un résidu d'alanine remplace la sérine en position 37.

Les taux de phosphorylation des différentes sous-fractions de l'histone H1 sont donc liés à des modifications dans la structure primaire de cette protéine (LANGAN et coll., 1971)

Le deuxième site de phosphorylation est localisé sur le résidu de sérine en position 106. La phosphorylation de la sérine 106 s'effectue par l'intermédiaire d'une seconde kinase spécifique non activée par l'A M P cyclique.

Dans les cellules en division, (foie en régénération, testicule de Truite, Ovaire d'Hamster de Chine, cellules Hela), jusqu'à 85 p. cent des molécules de H 1 sont phosphorylées en 1 à 4 sites. (LOUIE et DIXON, 1972 ; LAKE et SALZMAN, 1972 ; CHALKLEY et coll., 1973)

Ces sites de phosphorylation sont distincts des résidus de sérine 37 et 106. La kinase associée à la croissance cellulaire n'est pas activée par l'AMP cyclique et elle phosphoryle les résidus de thréonine comme les résidus de sérine (LANGAN et HOHMANN, 1975).

Si la phosphorylation de sites spécifiques dans les cellules en division est associée à une structure particulière de la chromatine, on peut s'attendre à ce que les sites de phosphorylation au cours de la mitose soient différents des sites de phosphorylation de la phase S : ceci expliquerait les modifications de structure de la chromatine au cours de ces 2 phases du cycle cellulaire et justifierait l'intérêt particulier apporté à la détermination des sites de phosphorylation de l'histone à des moments donnés du cycle cellulaire.

Parmi les 5 fractions d'histones, l'histone H 1 est incontestablement la plus activement phosphorylée. L'identité de la seconde histone activement phosphorylée in vivo est l'objet de controverses : longtemps identifiée à l'histone H 2 B qui est un bon substrat pour les kinases in vitro, il semble que in vivo le taux de phosphorylation de l'histone H 2 A soit supérieur à celui de l'histone H 2 B (GURLEY et WALTERS, 1973) : une contamination possible de ces histones par des protéines non-histones phosphorylées pourrait être à l'origine de cette confusion. De plus, les histones H 2 A et H 2 B ont une migration voisine en électrophorèse en gel de polyacrylamide. La phosphorylation de l'histone H 2 A, en diminuant la charge positive de la protéine, entraîne une migration plus lente de H 2 A qui coïncide alors avec la migration de l'histone H 2 B

Pour cette raison, dans notre laboratoire, nous avons entrepris parallèlement la détermination in vitro des sites de phosphorylation de l'histone H 2 B de thymus de Rat et de l'histone H 2 A - α de chloroleucémie du Rat.

D'autre part, l'histone H 2 A de chloroleucémie du Rat présente un certain polymorphisme qui résulte de substitutions partielles au niveau des résidus 16 et 99. C'est ainsi que 80 p. cent des molécules d'histone H 2 A de chloroleucémie du Rat (LAINE et coll., 1976) ont un résidu de sérine en position 16 tandis que les 20 p. cent restants ont un résidu de thréonine en cette position. Compte tenu des variations déjà observées dans la phosphorylation des sous-fractions de l'histone H 1, il nous a paru intéressant d'étudier les sites de phosphorylation de cette histone afin de déterminer si le polymorphisme de l'histone H 2 A au niveau du résidu 16, ne constitue pas un site potentiel d'action des kinases.

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les travaux de SHLYAPNIKOV et coll., (1975) qui identifient la sérine 19 comme un site de phosphorylation dans l'histone H 2 A de thymus de Veau. Un deuxième site de phosphorylation dans l'histone H 2 A - α de chloroleucémie du Rat a été identifié sur la sérine N-terminale de la protéine. Ce site de phosphorylation a déjà été signalé par LOUIE (1973) dans l'histone H 2 A de Truite.

La détermination des sites de phosphorylation des histones H 2 B et H 2 A par une kinase isolée du pancréas de Rat, nous permet de dire que l'histone H 2 B est plus activement phosphorylée, *in vitro*, que l'histone H 2 A : 4 sites de phosphorylation ont été déterminés dans l'histone H 2 B de thymus de Rat en position 32, 36, 87 et 91 alors que l'histone H 2 A de chloroleucémie du Rat est phosphorylée sur les résidus de sérine 1 et 19.

Ces sites sont localisés dans des séquences riches en résidus basiques qui interagissent avec le D NA mais ces études ont été réalisées sur des histones isolées et nous envisageons d'étudier l'action de la kinase de pancréas de Rat sur le complexe que forment les histones H 2 A et H 2 B, puis sur le nucléosome reconstitué afin de savoir si la structure de la chromatine ne rend pas inaccessible aux kinases certains de ces sites.

3) influence de la phosphorylation sur la liaison histones-D N A

Comme un paradoxe de la constance de la structure primaire des histones au cours de l'évolution, ces protéines sont parmi celles qui présentent la plus grande variété de modifications post-synthétiques.

Les sites de modifications (acétylation, phosphorylation, méthylation) sont généralement localisés dans les régions basiques N-terminales des histones H 2 A, H 2 B, H 3 et H 4.

Dans l'histone H 1, les sites de phosphorylation sont localisés dans la région C-terminale où s'accumulent la plupart des résidus basiques de la protéine. Ces régions riches en acides aminés basiques sont le siège des liaisons ioniques entre le groupe ϵ -aminé de la lysine ou le groupe guanidyle de l'arginine et les groupes phosphate du D N A.

L'apport de charges négatives, par la phosphorylation, dans ces régions basiques liées au D N A, entraîne une certaine répulsion entre histones et D N A.

La coexistence, sur des résidus adjacents de sites de méthylation qui augmentent la charge cationique des histones et de sites de phosphorylation ou d'acétylation qui la diminuent, a été rapportée par DE LANGE et coll., (1972) dans les histones H3 et H 4 de thymus de Veau.

Alors que l'acétylation et la phosphorylation sont des réactions réversibles qui apparaissent essentiellement au cours de la phase S du cycle cellulaire, la méthylation semble irréversible (BYVOET et coll., 1972) et a lieu plus tardivement au cours du cycle cellulaire (SEDWICK et coll., 1972)

Ces modifications chimiques entraînent des modifications de structure de la protéine qui peuvent affecter son affinité pour le D N A et l'empêcher de remplir sa fonction dans le maintien de la structure condensée du D N A

CONCLUSION

Les difficultés rencontrées pour préparer l'histone H 2 B à l'état pur ont longtemps constitué un facteur limitant les études structurales comparatives, alors que pour les histones riches en arginine H 2 A, H 3 et H 4, ces études ont été particulièrement développées.

Ces difficultés peuvent s'expliquer par l'existence d'un complexe équimoléculaire que forme l'histone H 2 B avec l'histone H 2 A.

Ce complexe, mis en évidence pour la première fois à Lille, par SKANDRANI et coll., (1972) a été observé également par KELLEY (1973) et par D'ANNA et ISENBERG (1974).

La fraction F 2 b de JOHNS qui constitue le matériel de départ pour l'isolement de l'histone H 2 B, est très hétérogène, les contaminants de l'histone H 2 B étant l'histone H 2 A, l'histone H 3 et des protéines non-histones acido-solubles.

Les méthodes chromatographiques que nous avons utilisées (gel filtration, échangeur d'ions) ne nous ont pas permis d'éliminer totalement l'histone H 2 A.

Pour cette raison, nous avons mis au point une méthode d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide qui nous a permis d'isoler l'histone H 2 B en une seule étape dans un état de pureté très satisfaisant.

Nous avons caractérisé l'histone H 2 B de Rat par son comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide qui est identique à celui de l'histone H 2 B de thymus de Veau, mais le comportement électrophorétique ne constitue pas à lui seul un critère suffisant d'analogie entre 2 protéines.



D'ailleurs, en nous référant aux travaux effectués dans notre laboratoire, l'histone H 2 A de chloroleucémie du Rat a une mobilité électrophorétique identique à celle de l'histone homologue de thymus de Veau. Sa composition en acides aminés ainsi que sa structure primaire sont voisines de celles de l'histone H 2 A de Veau. Toutefois, un certain polymorphisme qui se traduit par la présence de 3 histones H 2 A a été mis en évidence par LAINE et coll., (1976). Ce polymorphisme résulte de substitutions partielles au niveau du résidu de sérine en position 16 (Ser \longleftrightarrow Thr) et du résidu de lysine en position 99 (Lys \longleftrightarrow Arg)

Ces différences n'apparaissent ni en électrophorèse, ni dans la composition en acides aminés.

Seule la détermination de la séquence en acides aminés a révélé ces substitutions.

C'est pourquoi, bien que les histones H 2 B du Rat aient une composition en acides aminés assez voisine de celle de l'histone H 2 B de thymus de Veau, nous avons recherché si ces histones ne présentaient pas également certaines modifications dans leur séquence en acides aminés ; nous avons donc entrepris l'étude de leur structure primaire.

Les résultats que nous avons obtenus montrent une parfaite identité de séquence de l'histone H 2 B de Rat et de l'histone H 2 B de Veau

Des travaux similaires ont été réalisés sur l'histone H 2 B de Truite (KOOTSTRA et BAILEY, 1976), sur l'histone H 2 B d'Oursin *Parechinus Angulosus* (STRICKLAND, 1976) et sur l'histone H 2 B de Pois (JOHNSON, communication personnelle).

Nous avons rassemblé dans le Tableau XVI, la composition en acides aminés de ces histones H 2 B par comparaison avec l'histone homologue de thymus de Veau.

(x) Les résultats présentés dans ce tableau ont été déterminés par :

- IWAI et coll. (1970) H 2 B de thymus de Veau

- KOOTSTRA et BAILEY (1976) H 2 B de testicules de Truite

- WOUTERS-TYROU et coll. (1977) : mélange des 2 sous-fractions de l'histone H 2 B de gonades d'Ourdin *Psammechinus Miliaris* (P.M.)

- STRICKLAND (communication personnelle) : Histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 de gonades d'Oursin *Parechinus Angulosus* (P.A.)

- JOHNSON (communication personnelle) : Histone H 2 B de Pois

TABLEAU XVI

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H 2 B (x)
(en nombre de résidus par molécule d'histone)

Acides Aminés	Thymus de Veau	Testicules de Truite	Gonades d'Oursin			Pois
			P.M.	P.A. H 2 B - 1	P.A. H 2 B - 2	
Acide aspartique	6	5	7	5	5	9
Thréonine	8	9	10	12	9	8
Sérine	14	14	19	15	18	10
Acide glutamique	10	9	11	11	8	15
Proline	6	5	7	7	8	8
Glycine	7	9	16	14	12	9
Alanine	13	12	11	10	12	16
Valine	9	8	11	12	11	9-10
Méthionine	2	2	2	2	2	2
Isoleucine	6	7	5	4	5	9
Leucine	6	6	7	6	6	8
Tyrosine	5	5	4	5	4	3
Phénylalanine	2	2	2	2	2	4
Histidine	3	3	2	2	2	2
Lysine	20	19	15	16	14	29
Arginine	8	8	22	21	25	6
Nombre de résidus	125	123	150	144	143	147-148
Basiques	28	27	37	37	39	35
Acides	16	14	18	16	13	24
Basiques/Acides	1.75	1.92	2.05	2.31	3.0	1.45
Lys/Arg	2.5	2.37	0.68	0.76	0.56	4.83
N-terminal	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	non déterminé



Si l'histone H 2 B de Truite ne présente pas de modification profonde par rapport à celle de l'histone homologue de thymus de Veau, les histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 de l'Oursin *Parechinus Angulosus* (STRICKLAND, 1976), de l'Oursin *Psammechinus Miliaris* (WOUTERS-TYROU, 1977) et du Pois (JOHNSON, communication personnelle) s'en différencient par leur poids moléculaire plus élevé (16.000 daltons environ au lieu de 13.700 pour l'histone H 2 B de thymus de Veau .

L'histone H 2 B de Pois est particulièrement riche en lysine (29 résidus), ce qui lui confère un rapport Lysine/Arginine de 4.83. Elle est également riche en alanine (16 résidus) et en résidus acides, surtout en acide glutamique (15 résidus) ; par contre le taux de sérine est moins élevé que dans l'histone H 2 B de thymus de Veau .

Les histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 de l'Oursin *Parechinus Angulosus* sont riches en arginine (21 et 25 résidus, respectivement), ce qui leur confère un rapport Lysine/Arginine inférieur à l'unité, caractéristique des histones riches en arginine . Elles sont également riches en glycine .

Toutefois, elles gardent la nomenclature H 2 B en raison de plusieurs critères :

- Les histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 d'Oursin ont la solubilité de l'histone H 2 B de thymus de Veau : elles sont préparées par la méthode d'extraction sélective de JOHNS (1967)

- les histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 sont riches en sérine .

- comme l'histone H 2 B de thymus de Veau, elles possèdent un résidu de proline en position N-terminale .

Les différences dans la composition en acides aminés des histones H 2 B isolées de plusieurs espèces apparaissent de façon plus nette lors de la détermination de la séquence en acides aminés de ces protéines (Tableaux XVII et XVIII)

TABLEAU XVII

SEQUENCES N-TERMINALES DES HISTONES H 2 B

Veau	Pro-	-Glu-	-	5	-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-	10	-Pro-Ala-Pro-Lys-	
Truite	Pro-	-Glu-		5	-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-		-Lys-	
Oursin H 2 B - 1	Pro-Ser-Gln-	5	Lys-Ser-Pro-Thr-	10	Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-	15	Lys-Arg-Ser-Pro-Thr-Lys-Arg-Ser-	
H 2 B - 2	Pro-		5	-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Thr-Ser-Pro-	10	Arg-Lys-Gly-Ser-Pro-	15	Arg-Lys-Gly-Ser-
Veau							15	-Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-Ala-
Truite							10	-Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-Ala-
Oursin H 2 B - 1	Pro-Gln-Lys-Gly-Gly-	25			30	-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys-Ala-	35	
H 2 B - 2	Pro-Ser-Arg-Lys-Ala-Ser-Pro-Lys-Arg-Gly-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-Ala-Gly-Lys-Gly-	20	25	30	35			



TABLEAU XVII

SEQUENCES N-TERMINALES DES HISTONES H 2 B (suite)

Veau	20	25	30	
	Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-Lys-			
Truite	20	25	30	
	Val-Thr-Lys-Thr-Ala-Gly-Lys-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Arg-Lys-			
Oursin	40	45	50	
H 2 B - 1	Gly-Lys-Arg-Arg-Arg-Gly-Val-Gln-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg			
H 2 B - 2	40	45	50	
	Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Val-Val-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-			



TABLEAU XVIII

SEQUENCES C-TERMINALES DES HISTONES H 2 B

Veau	35	40	45	50	
	Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-				
Truite		-Ala-Ile-			
Oursin H 2 B - 1		-Gly-Ile- Ile-			
H 2 B - 2		-Gly-Ile- Ile-			
Veau	55	60	65	70	
	Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Val-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-				
Truite		-Ile-			
Oursin H 2 B - 1		-Arg- Ser-Val-			
H 2 B - 2		-Arg- Ser-Val-			
Veau	75	80	85	90	
	Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-Ile-				
Truite		-Ser-			
Oursin H 2 B - 1		-Ala-Gly- Thr-Thr-Tyr- Arg- Val-Ser-			
H 2 B - 2		-Ala-Ser- Thr-Ser-Ala- Arg- Val-Ser-			
Pois		-Arg- Lys-			



TABLEAU XVIII SEQUENCES C-TERMINALES DES HISTONES H 2 B (suite)

Veau	95	100	105	110
	Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-			
Truite				
Oursin H 2 B - 1				
H 2 B - 2				
Pois			-Val-	
Veau	115	120	125	
	Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Ser-Lys (OH)			
Truite			123	
			-Lys (OH)	
Oursin H 2 B - 1			144	
			-Thr-	
H 2 B - 2			143	
			-Thr-	
Pois			-Arg (OH)	



Chez l'Oursin comme chez la Truite, les modifications de structure sont essentiellement localisées dans la région N-terminale de la protéine (Tableau XVII), la partie C-terminale étant plus généralement le siège des modifications de caractère conservatif (Tableau XVIII). Pour ne pas surcharger ce tableau, nous avons fait figurer uniquement les substitutions dans la séquence par comparaison avec la séquence de l'histone homologue de thymus de Veau.

Comme le laissait prévoir la composition en acides aminés, l'histone H 2 B de Truite est peu modifiée par rapport à l'histone H 2 B de Veau. Elle est essentiellement caractérisée par la délétion de l'enchaînement Ala - Pro dans la région N-terminale.

Chez l'Oursin, les histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 ne présentent, dans leur région N-terminale (résidus 1 à 34), qu'une analogie lointaine avec l'histone homologue de thymus de Veau (Tableau XVII) :

On y rencontre des séquences répétitives (Tableau XIX) et des multiplets arginine caractéristiques (Tableau XVII) :

C'est ainsi que dans l'histone H 2 B - 1, du résidu 5 au résidu 19, on trouve 3 fois la séquence :

Ser - Pro - Thr - Lys - Arg

De la même façon dans l'histone H 2 B - 2, on trouve une certaine répétition de séquences homologues :

Ser - Pro - Arg - Lys - Gly

Les multiplets arginine (résidus 40 à 42 et 48 à 53 pour H 2 B - 1 ; résidus 39 à 43 et 47 à 52 pour H 2 B - 2) ne sont pas sans évoquer une des caractéristiques structurales des protamines. La présence de ces multiplets arginine dans les histones H 2 B du sperme d'Oursin doit-elle être liée à l'origine de ces histones ou n'est-elle qu'une caractéristique bien particulière des histones H 2 B dans les organismes primitifs ? La réponse à ces questions ne pourra être apportée que par l'étude de l'histone H 2 B isolée de l'embryon d'Oursin.

Dans la partie N-terminale des histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 d'Oursin, on rencontre également une séquence homologue commune aux histones riches en arginine H 2 A et H 4 (Tableau XX).

Les analogies structurales observées entre les histones H 2 B d'Oursin d'une part, et les histones H 2 B, H 2 A, H 4 et les protamines d'autre part, ne permettent pas de conclure comme l'ont fait STRICKLAND et coll., (1974) que les histones H 2 B d'Oursin constituent une étape intermédiaire entre les histones riches en lysine et les histones riches en arginine.

Si nous comparons les résultats obtenus par IWAI sur l'histone H 2 B de thymus de Veau avec les résultats de KOOTSTRA et BAILEY sur l'histone H 2 B de Truite et STRICKLAND et coll. sur les histones H 2 B d'Oursin, nous remarquons que les modifications les plus nombreuses et les plus importantes sont localisées dans la région basique non structurée N-terminale qui est le siège d'interactions ioniques avec les groupements phosphates du D N A.

L'étude de la séquence en acides aminés permet de mettre en évidence dans l'histone H 2 B, comme dans les autres histones H 1, H 2 A, H 3 et H 4, une certaine asymétrie dans la distribution des résidus. L'existence de centres basiques est localisée, pour les histones H 2 A, H 2 B, H 3 et H 4 à l'extrémité N-terminale de la protéine. Ces régions renferment aussi une grande proportion de proline, sérine et glycine qui favorisent une structure étalée de la chaîne.

Les régions centrales et C-terminales des histones H 2 A, H 2 B, H 3 et H 4 renferment une forte proportion de résidus apolaires. Ces régions particulièrement structurées (hélices α , feuillets β) sont relativement stables au cours de l'évolution des espèces. Elles sont le siège des interactions histone - histone. D'ANNA et ISENBURG (1974) ont observé, par des méthodes physico-chimiques, l'existence d'interactions fortes et hautement spécifiques entre les histones H 2 A - H 2 B, H 2 B - H 4 et H 3 - H 4. La formation de ces complexes est accompagnée d'une augmentation de structure en hélice α .

TABLEAU XX

Homologie de séquence entre les histones H 2 B - 1 et H 2 B - 2 de l'Oursin
Parechinus Angulosus (P.A.) et les histones H 2 A et H 4 de l'Oursin *Psammechinus
 miliaris*. (P.M.)

	26		32
H 2 B - 1 Oursin (P.A.)	Lys - Gly - Gly - Lys - Gly - Ala - Lys		
	27		33
H 2 B - 2 Oursin (P.A.)	Arg - Gly - Gly - Lys - Gly - Ala - Lys		
		36	40
		Gly - Lys - Gly - Gly - Lys	
	3		8
H 2 A Oursin (P.M.)	Arg — Gly - Lys - Gly - Ala - Lys		
	3		8
H 4 Oursin (P.M.)	Arg — Gly - Lys - Gly - Gly - Lys		



Plus récemment, MARTINSON et coll. (1976) ont montré que la formation de "pontages" entre histones était hautement sélective : ainsi le traitement de la chromatine par le tétranitrométhane (T N M) induit la formation de dimères H 2 B - H 4 où les 2 histones sont liées par l'intermédiaire de résidus de tyrosine (MARTINSON et Mc CARTHY, 1976) situés dans la partie C-terminale de chacune des 2 histones. Par contre, le traitement de la chromatine par irradiation ultra-violette induit la formation de complexe H 2 A - H 2 B : la liaison s'effectue par l'intermédiaire du résidu de phénylalanine 25 de l'histone H 2 A et du résidu de tyrosine 40 de l'histone H 2 B ; ces 2 résidus sont situés dans les zones structurées des histones H 2 A et H 2 B (Figures 11 et 12, FASMAN et coll., 1976), zones qui participent aux interactions histone - histone. Par contre, les sites d'interactions des histones H 4 et H 2 B sont localisés dans la partie C-terminale. La mise en évidence d'un trimère H 2 A - H 2 B - H 4 après traitement de la chromatine simultanément par les U V et par le T N M serait en faveur de l'existence, dans l'histone H 2 B de 2 sites différents d'interaction histone - histone.

Ces études menées par MARTINSON et Mc CARTHY (1976) viennent confirmer les résultats obtenus par D'ANNA et ISENBURG (1974) selon lesquels les histones possèdent au moins 2 sites distincts et spécifiques d'interaction avec les autres histones, et en particulier l'histone H 2 B serait complexée de façon spécifique et simultanée avec les histones H 2 A et H 4.

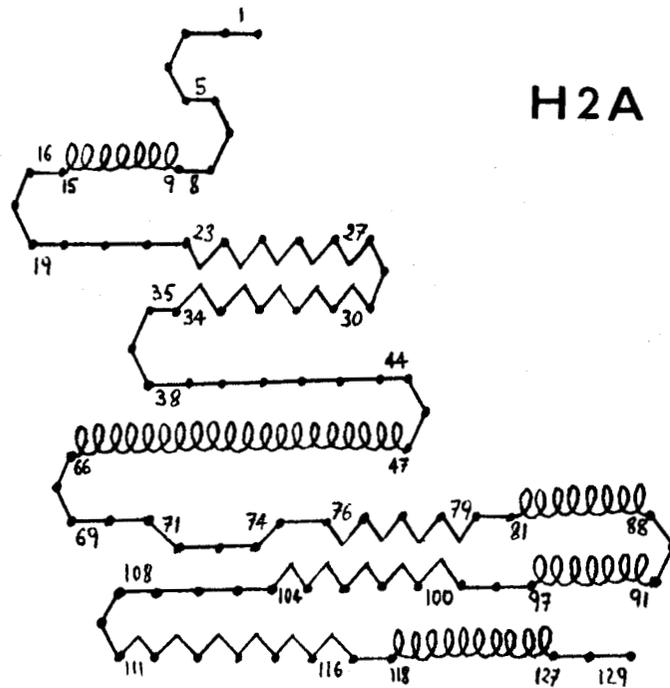
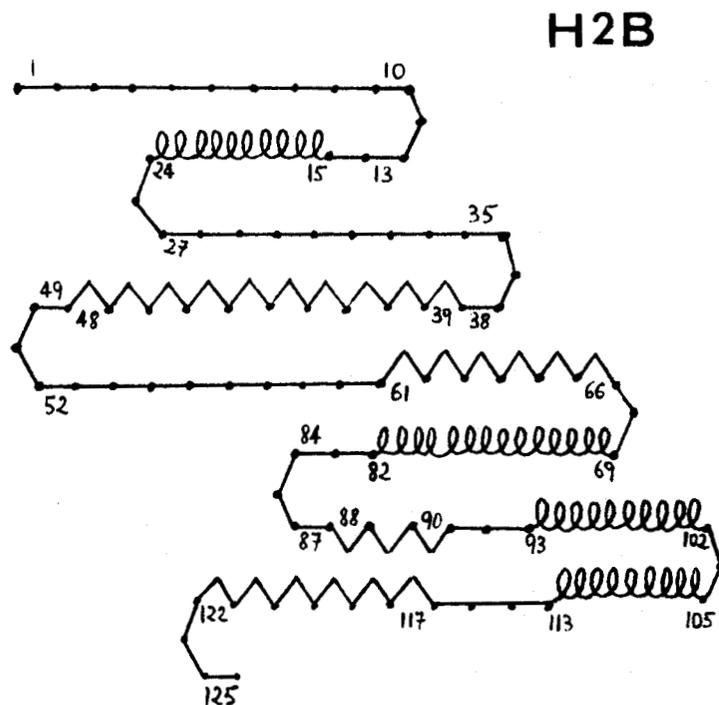


Figure 11

Prédiction de la structure secondaire de l'histone H 2 A (FASMAN et coll.1976)

Les résidus sont représentés en hélice α (D), feuillets β (\wedge) et non structurés _____



BUS
LILLE

Figure 12

Prédiction de la structure secondaire de l'histone H 2 B (FASMAN et coll.1976)

Les études que nous avons menées sur l'histone H 2 B de Rat (thymus et chloroleucémie) nous ont permis :

- de mettre au point une méthode simple d'isolement de l'histone H 2 B (électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide)
- de rechercher d'éventuelle modification dans la structure primaire d'histones riches en lysine isolées de tissu sain et de tissu cancéreux.
- de mettre au point une méthodologie adaptée à la détermination de la séquence en acides aminés de l'histone H 2 B
- de déterminer les sites de phosphorylation in vitro de cette histone par une kinase isolée du pancréas de Rat et dépendant de l'A M P cyclique : ce travail s'inscrit dans un ensemble de recherches, entreprises récemment au laboratoire avec la collaboration de Monsieur le Professeur MARCHIS-MOUREN de l'Université d'Aix-Marseille.

Nous pensons dans un proche avenir étendre ces études à la phosphorylation des complexes d'histones (H 2 A - H 2 B , H 4 - H 2 B, H 3 - H 4) ainsi qu'à la phosphorylation du nucléosome reconstitué afin de déterminer si l'association des histones ne modifie pas leur accessibilité à l'action des kinases.

	<u>Pages</u>
ADLER A.J. et FASMAN G.D.	10
WANGH L.J. et ALLFREY V.G. , (1974) Altered Conformational effects of naturally acetylated histone f 2 a 1 (IV) in f 2 a 1 - Déoxyribonucleic Acid Complexes Circular Dichroisme Studies . <u>J. Biol. chem</u> , <u>249</u> , 2911-2914	
BAILEY G.S. et DIXON G.H., (1973) Histone II b 1 from rainbow trout . Comparison in amino acid séquence with calf thymus II b 1 <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>248</u> , 5463-5472	6
BAKAYEN V.V., MELNIKOV A.A., OSICKA V.D. et VARSHAUSKY A.J., (1975) <u>Nucleic Acids Res.</u> , <u>2</u> , 1401-1419	24
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	20,21,23
BALHORN R., CHALKLEY R. et GRANNER D.,(1972-a) Lysine - rich histone Phosphorylation .A positive correlation with Cell replication . <u>Biochemistry</u> , <u>11</u> , 1094-1098	12
BALHORN R., BALHORN M. , MORRIS H.P. et CHALKLEY R., 1972-b) Comparative high-resolution electrophoresis of Tumor Histones : Variation in phosphorylation as a function of Cell replication rate . <u>Cancer Research</u> , <u>32</u> , 1775-1784	13

- DE LANGE R.J., FAMBROUGH M., SMITH E.L. et 17
 BONNER J., (1969-c)
 Calf and Pea histone IV
 II- The complete amino acid sequence of Calf thymus
 histone IV : presence of ϵ -N-acetyllysine
J. Biol. Chem., 244, 319-334
- DE LANGE R.J., HOOPER J.A. et SMITH E.L., (1972) 4,98
 Complete amino acid sequence of Calf thymus histone III
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 69, 882-884
- DE LANGE R.J., HOOPER J.A. et SMITH E.L., (1973) 9,15
 Histone III
 III- Sequence studies on the cyanogen bromide peptides ;
 complete amino acid sequence of Calf thymus histone III
J. Biol. Chem., 248, 3261-3274
- DE LANGE R.J. et SMITH E.L., (1975) 2
 Histone function and evolution as viewed by sequence studies
Ciba Found. Symp., 28, 59-70
- DESAI L.S. et FOLEY G.E., (1970) 6
 Homologies of amino acid composition and structure of histone
 H 2 a 1 isolated from human leukaemic cells
Biochem. J., 119, 165-170
- DIXON G.H., CANDIDO E.P.M., HONDA B.M., LOUIE A.J. 10
 MACLEOD A.R. et SUNG M.T., (1975)
 The biological roles of post-synthetic modifications of
 basic nuclear proteins.
Ciba Found. Symp., 28, 229-258

- HEMPEL K., LANGE H.W. et BIRKHOFFER L., (1968) 15
Naturwissenschaften, 55, 37
- HEWISH D.R. et BURGOYNE L.A. (1973) 21
 Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin D N A
 at regularly spaced by a nuclear D N A se
Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 504-510
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H., (1960) 52
 The sequence of the aminoacid residues in performic
 acid-oxidized ribonuclease
J. Biol. Chem. 235, 633-647
- HNILICA L.S., KAPPLER H.A. et JORDAN J.J., (1970) 4, 32, 33
 Assymetry in the distribution of basic amino acid residues
 40, 43
 in the moderately lysine-rich histone F 2 b from Calf thymus
Experientia, 26, 353-355
- HUANG R.C.C. et HUANG P.C., (1969) 19
 Effect of protein-bound R N A Associated with chick
 embryo chromatin on template specificity of the chromatin
J. Mol. Biol., 39, 365-378
- IWAI K., ISHIKAWA K. et HAYASHI H., (1970) 4, 32, 33
 Amino-acid sequence of slightly lysine-rich histone 39, 43, 44
Nature, 226, 1056-1058 78, 101
- JOHNS E.W., (1964) 29, 30
 Studies on histones. 7- preparation methods for histone
 fractions from Calf thymus
Biochem. J., 92, 55-59

- JOHNS E.W., (1967) 29,102
 A method for the selective extraction of histone fractions F 2 a 1 and F 2 a 2 from Calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7.0
Biochem. J., 105, 611-614
- KALTSCHMIDT E. et WITTMANN H.G., (1970) 34
 Ribosomal proteins . VII Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins
Anal. Biochem., 36, 401-412
- KELLEY R.I., (1973) 99
 Isolation of a histone IIb 1 - II b 2 complex
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1588-1594
- KLEINSMITH L.J., ALLFREY V.G. et MIRSKY A.E., (1966) 10,19
 Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei
Proc. Nat. Acad. Sci. U S , 55, 1182-1189
- KLEINSMITH L.J., (1973) 19
 Specific binding of phosphorylated nonhistone chromatin proteins to deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem., 248, 5648-5653
- KLEINSMITH L.S., (1975) 19
 Do phosphorylated proteins regulate gene activity ?
 dans " Chromosomal Proteins and their role in the regulation of gene expression"
 Edité par : Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London, 45-57

- KLEINSMITH L.J., STEIN J. et STEIN G., (1975) 19
 Direct evidence for a functional relation ship between nonhistone
 chromosomal protein phosphorylation and gene transcription
 dans "chromosomal Proteins and their role in the regulation of gene
 expression"
 édité par : Academic Press, Inc, New York, San Francisco,
 London 59-66
- KOOTSTRA A. et BAILEY G.S. (1976) 7, 100
 The primary structure of histone H 2 b from brown trout
 (Salmo trutta) testes 101
FEBS Letters, 68, 76-78
- KRUH J., COURTOIS Y. et TICHONICKY L., (1975) 12
 Phosphorylation and protein kinase activities of chromosomal
 non histone proteins from chick embryo fibroblasts
Biochimie, 57, 1323-1329
- KUO J.F., et GREENGARD P., (1970) 81
 Cyclic nucleotide dependent protein kinases
 VII comparison of various histones as substrates for
 adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and guanosine 3',5'-
 monophosphate-dependent protein kinases
Biochim. Biophys. Acta, 212, 434-440
- LAINÉ B., SAUTIERE P, et BISERTE G., (1976) 6,97,
 Primary structure and microheterogeneities of Rat
 chloroleukemia histone H 2 A 100
Biochemistry, 15, 1640-1645

- LAKE R.S. et SALZMAN N.P., (1972) 96
 Occurrence and properties of a chromatin-associated F 1-
 histone kinase in mitotic Chinese hamster Cells
Biochemistry, 11, 4817-4826
- LAKE R.S. (1973) 12
 F 1 -Histone Phosphorylation in Metaphase Chromosomes
 of cultured Chinese Hamster Cells
Nature New Biol., 242, 145-146
- LANGAN T.A. et SMITH L.K., (1967) 12
 Phosphorylation of Histones and Protamines by a specific
 protein kinase from liver
Fed. Proc., 26, 603
- LANGAN T.A., (1971) 95
 Phosphorylation of separate sites in lysine-rich histone
 by cyclic A M P-dependent and independent protein kinases
Fed. Proc., 30, 1089
- LANGAN T.A., RALL S.C. et COLE R.D., (1971) 95
 Variation in primary structure at a phosphorylation site in lysine-rich
 histone
J. Biol. Chem., 246, 1942-1944
- LANGAN T.A. et HOHMANN P., (1975) 13,96
 Analysis of specific phosphorylation sites in lysine-rich
 (H1) histone : An approach to the détermination of structural
 chromosomal protein functions ; dans "chromosomal Proteins and
 their role in the regulation of gene expression"
 édité par : Académic Press, Inc, New York, San Francisco,
 London, 113-125

- LANGMORE J.P. et WOOLEY J.C., (1975) 20
 Chromatin architecture ; investigation of a subunit
 of chromatin by dark field électron microscopy
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 72, 2691-2695
- LEVY R., LEVY S., ROSENBERG S.A. et 17
 SIMPSON R.T., (1973)
 Selective stimulation of non histone chromatin protein
 Synthesis in lymphoid cells by phytohemagglutinin
Biochemistry, 12, 224-228
- LI H.J.(1975) 21
 A model for chromatin structure
Nucleic Acids Res., 2, 1275-1289
- LIU T.Y., STEIN W.H., MOORE S. et ELLIOTT S.D.(1965) 49
 The sequence of amino acid residues around the sulfhydryl :
 group at the active site of a streptococcal proteinase
J. Biol. Chem. , 240, 1143-1149
- LOUIE A.J. et DIXON G.H.,(1972) 96
 Trout testis cells
 II synthèsis and phosphorylation of histones and protamines in
 different cell types
J. Biol. Chem., 247, 5498-5505

- LOUIE A.J., SUNG M.T. et DIXON G.H.(1973) 14,15,97
 Modification of histones during spermatogenesis
 in trout
 III Levels of phosphohistone species and kinetics
 of phosphorylation of histone H 2 B
J. Biol. Chem., 248, 3335- 3340
- Mac GILLIVRAY A.J. et RICKWOOD D.,(1974) 18
 The heterogeneity of mouse chromatin nonhistone proteins
 as evidenced by two-dimensional polyacrylamide gel
 electrophoresis and ion-exchange chromatography
Eur. J. Biochem., 41, 181-190
- MANGEAT P. MARTINAGE A., CHAHINIAN H., 92,93
 SAUTIERE P. et MARCHIS-MOUREN G.(1977)
 Studies on the phosphorylation of Rat thymus H 2 B
 histone by the cyclic A M P dependent protein kinase
 from Rat pancreas.
 12ème congrès de la FEBS - Copenhague
- MARTINAGE A., SAUTIERE P., KERCKAERT J.P. et 34
 BISERTE G.,(1976)
 Purification by preparative electrophoresis and
 characterization of histone H 2 B from Rat
 chloroleukaemia
Biochim. Biophys. Acta., 420, 37-41

- MARTINSON H.G. et Mc CARTHY, (1976) 111
 Histone - histone interactions within chromatin.
 Preliminary Characterization of presumptive
 H 2 B - H 2 A and H 2 B - H 4 binding sites.
Biochemistry, 15, 4126-4131
- MARTINSON H.G., SHETLAR M.D. et 111
 Mc CARTHY B.J., (1976)
 Histone - histone interactions within chromatin.
 Cross-linking studies using ultraviolet light
Biochemistry, 15, 2002-2007
- MURRAY K/., (1964) 15
 The occurrence of ϵ -N-methyllysine in histones
Biochemistry, 3, 10-15
- NOLL M., THOMAS J.O. et KORNBERG R.D., (1975) 21,24
 Preparation of native chromatin and damage caused by
 steaming
Science, 187, 1203-1206
- OGAWA Y., QUAGLIAROTTI G., JORDAN J., 4
 TAYLOR C.W., 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

- OLINS A.L. et OLINS D.E., (1974) 20
 Spheroid chromatin units(\cup bodies)
Science, 183, 330-332
- ORD M.G. et STOCKEN L.A., (1966) 10,95
 Metabolic properties of histones from Rat liver
 and thymus gland
Biochem. J., 98, 888-897
- ORRICK L.R., OLSON M.O.J. et BUSCH H., (1973) 17
 Comparison of nucleolar proteins of normal Rat liver
 and Novikoff Hepatoma Ascites cells
 by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 70, 1316-1320
- OUDET P., GROSS-BELLARD M. et CHAMBON P., (1975) 20,21
 Electron microscopic and biochemical evidence that
 chromatin structure is a repeating unit
Cell, 4, 281-300
- PAIK W.K. et KIM S., (1967) 15
 ϵ -N-dimethyllysine in histones
Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, 479-483
- PANYIM S., JENSEN R.H., CHALKLEY R., (1968) 28
 Proteolytic contamination of calf thymus nucleohistone
 and its inhibition.
Biochim. Biophys. Acta., 160, 252-255
- PANYIM S. et CHALKLEY R., (1969) 30,31
 High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346

- PLANCHON B., (1973) 53
 Les méthodes chimiques récurrentes de détermination
 de la séquence N-terminale des peptides et des
 protéines : la méthode d'Edman
Thèse de Docteur-Ingénieur, Lille
- RUIZ-CARRILLO A., WANGH L.J. et ALLFREY V.G., (1975) 15,16
 Processing of newly synthesized histone molecules
Science, 190, 117-128
- SAUTIERE P., MOSCHETTO Y., DAUTREVAUX M.
 et BISERTE G., (1970- a) 17,46
 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 G., (1970-b) 6
 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., TYROU D., MOSCHETTO Y. et
 BISERTE G., (1971) 6,17, 26
 Structure primaire de l'histone riche en glycine et 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) 4,6
 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., TYROU D., LAINE B., MIZON J., 72,90
 RUFFIN P. et BISERTE G., (1974)
 Covalent structure of calf thymus ALK-histone
Eur. J. Biochem., 41, 563-576
- SAUTIERE P., BRIAND G., KMIETIK D., LOY O., 4
 et BISERTE G., GAREL A. et CHAMPAGNE M., (1976)
 Chicken erythrocyte histone H 5
 III Sequence of the amino-terminal half of the molecule
 (111 residues)
FEBS Letters, 63, 164-166
- SEDWICK W.D., WANG T.S.F. et KORN D., (1972) 98
 Purification and properties of nuclear and cytoplasmic
 deoxyribonucleic acid polymerases from human KB cells
J. Biol. Chem., 247, 5026-5033
- SEGAL H.L., (1973) 12
 Enzymatic interconversion of active and inactive forms
 of enzymes
 a new mechanism of metabolic control has become evident
Science, 180, 25-32
- SENSHU T. et IWAI K., (1970) 32
 Fractionation of Calf thymus histone by a new method
 of C M -cellulose chromatography
J. Biochem., Tokyo, 67, 473-485
- SHEPHERD G.R., HARDIN J.M., et NOLAND B.J. (1972) 12,14
 Dephosphorylation of histone fractions of cultured Mammalian
 Cells
Arch. Biochem. Biophys, 153, 599-602

- SHLYAPNIKOV S.V., ARUTYUNYAN A.A., KUROCHKIN
S.N., MEMELOVA L.V., NESTEROVA M.V., SASHCHENKO
L.P. et SEVERIN E.S., (1975) 14,92,93
Investigation of the sites phosphorylated in lysine-rich
histones by protein kinase from pig brain
FEBS Letters, 53, 316-319 95,97
- SKANDRANI E., MIZON J., SAUTIERE P. et BISERTE G., (1972) 32,33,99
Etude de la fraction F 2 b des histones de thymus de Veau
Biochimie, 54, 1267-1272
- SOMMER K.R. et CHARKLEY R., (1974) 32
A new method for fractionating histones for physical
and chemical studies
Biochemistry, 13, 1022-1027
- SPELSBERG T.C. et HNILICA L.S., (1970) 19
Deoxyribonucleoprotéins and the tissue specific
restriction of D N A in chromatin
Biochem., J., 120, 435-437
- STEDMAN E. et STEDMAN E., (1950) 18
Cell specificity of histones
Nature, 166, 780-781
- STEELE W.J. et BUSCH H., (1963) 27
Studies on acidic nuclear proteins of the walker tumor
and liver
Cancer Research, 23, 1153-1163

- STHELIN D. et DURANTON H., (1969) 49
Dérivés dansylés des acides aminés. Chromatographie
monodimensionnelle et simultanée de plusieurs échan-
tillons sur une même couche mince
J. Chromatog., 43, 93-102
- STEIN G.S., SPELSBERG T.C. et KLEINSMITH L.J. (1974) 12
Nonhistone chromosomal Proteins and gene regulation
Non histone chromosomal proteins may participate in the
specific regulation of gene transcription in eu karyotes
Science, 183, 817-824
- STEIN G.S., STEIN J.S., KLEINSMITH L.J., (1975) 12,19
The role of the proteins associated with D N A in the nuclei
of higher organisms is, beginning to be understood. Apparently
the histones keep genes turned off and the nonhistone proteins
selectively turn them on
Scientific American, 232, 46-57
- STRICKLAND W.N., STRICKLAND M., BRANDT W.F., 109
MORGAN M. et VON HOLT C., (1974)
Partial amino acid sequence of two new arginine-serine
rich histones from male gonads of the sea urchin (*Perechinus angulosus*)
FEBS Letters, 40, 161-166
- SUNG M.T. et DIXON G.H., (1970) 72
Modification of histones during spermiogenesis in trout : a
molecular mechanism for altering histone binding to D N A
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 67, 1616-1623

- TENG C.S., TENG C.T. et ALLFREY V.G., (1971) 18
 Studies of nuclear acidic proteins. Evidence of their
 phosphorylation, tissue specificity, selective binding
 to deoxyribonucleic acid, and stimulation on transcription.
J. Biol. Chem., 246, 3597-3609
- TOCZKO K. et KALINSKI A., (1974) 29
 Effect of Triton X-100 on dissociation of histones
 from chromatin by NaCl
Bull. Acad. Pol. Sci. CI II, Vol. XXII, 163-165
- VAN DER WESTHUYZEN D.R., BOHM E.L. et 32, 33
 VON HOLT C., (1974)
 Fractionation of chicken erythrocyte whole histone into
 the six main components by gel exclusion chromatography
Biochim. Biophys. Acta, 359, 341-345
- VAN HOLDE K.E. et ISENBERG I., (1975) 20
 Histone interactions and chromatin structure
Accounts Chem. Res., 8, 327-335
- WILSON R.K., STARBUCK W.C., TAYLOR C.W., 6
 JORDAN J. et BUSCH H., (1970)
 Structure of the glycine-rich, arginine rich histone of
 the Novikoff hepatoma
Cancer Res., 30, 2942-2951
- WOUTERS-TYROU D., SAUTIERE P. et BISERTE G., (1976) 6
 Covalent structure of the sea urchin histone H 4
FEBS Letters, 65, 225-228

- WOUTERS-TYROU D., (1977) 6,101,
Les histones de gonades d'Oursin *Psammechinus Millaris* 102
Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences , Lille
- YEOMAN L.C., OLSON M.O.J., SUGANO N., 4
JORDAN J.J., TAYLOR C.W., STARBUCK W.C. et
BUSCH H., (1972)
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) 17
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

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
A) <u>Les histones</u>	2
1) caractérisation chimique	2
2) structure primaire	4
3) modifications chimiques des histones	7
a) l'acétylation	8
b) la phosphorylation	10
c) la méthylation	15
B) <u>Les protéines non-histones</u>	17
1) caractérisation chimique	17
2) spécificité de tissu	18
3) rôle dans la régulation de l'activité des gènes	18
C) <u>Données actuelles sur la chromatine</u>	20
<u>CHAPITRE 1 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE L'HISTONE H 2 B</u>	
A) <u>Préparation de la chromatine et extraction sélective des histones</u>	25
1) préparation des noyaux	26
2) Préparation de la desoxyribonucleoprotéine	27
a) à partir des noyaux	27
b) à partir du tissu	27

3) extraction des histones	28
a) dissociation de la chromatine par des solutions salines	28
b) dissociation de la chromatine par les acides inorganiques :	29
- extraction des histones totales	
- extraction sélectives des histones	
4) contrôle électrophorétique des différentes étapes de préparation et de purification des histones	30
B) <u>Isolement de l'Histone H 2 B</u>	32
1) essais d'isolement de l'histone H 2 B par des méthodes chromatographiques	33
2) isolement de l'histone H 2 B par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide	34
C) <u>Caractérisation de l'Histone H 2 B</u>	35
1) comportement électrophorétique	35
2) composition en acides aminés	35
3) détermination de l'extrémité N-terminale	41
4) détermination de l'extrémité C-terminale	41

CHAPITRE II - STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H 2 B

A) <u>Stratégie</u>	43
B) <u>Méthodes</u>	45
1) coupure au bromure de cyanogène	45
2) hydrolyse trypsique	46
a) conditions d'hydrolyse	46
b) fractionnement des peptides tryptiques	46

c) contrôle d'homogénéité et purification des fractions peptidiques	47
d) étude structurale des peptides tryptiques	49
- composition en acides aminés	
- détermination de l'extrémité N-terminale	
- dégradation des peptides par la méthode d'Edman	
- détermination de l'extrémité C-terminale	
3) dégradation automatique d'Edman de l'histone H 2 B de thymus de Rat	52
C) <u>Résultats</u>	55
1) coupure de l'histone H 2 B de chloroleucémie du Rat par le bromure de cyanogène	55
2) étude des peptides tryptiques de l'histone H 2 B	56
3) détermination de l'extrémité N-terminale de l'histone H 2 B de thymus de Rat par dégradation automatique d'Edman en phase liquide	76
4) Discussion	78

**CHAPITRE III - DETERMINATION DES SITES DE PHOSPHORYLATION
IN VITRO DE L'HISTONE H 2 B DE THYMUS DE RAT
PAR UNE KINASE PANCREATIQUE**

A) <u>Introduction</u>	81
B) <u>Méthodes</u>	82
1) phosphorylation <u>in vitro</u> de l'histone H 2 B de thymus de Rat par une kinase pancréatique	82
a) préparation de l'enzyme	
b) phosphorylation de l'histone H 2 B	83
2) Hydrolyse tryptique et repérage des peptides marqués au ³² P.	83

3) composition en acides aminés et détermination des sites de phosphorylation	84
C) <u>Résultats</u>	84
1) composition et séquence en acides aminés	
2) détermination des sites de phosphorylation	
D) <u>Conclusion</u>	92
1) variation des sites de phosphorylation avec l'origine tissulaire ou d'espèce de la protéine kinase	92
2) localisation du site de phosphorylation	93
3) influence de la phosphorylation sur la liaison histones - D N A	98
<u>CONCLUSION</u>	99
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	114

**Cette thèse
a été imprimée
sur offset
par
le Service Polycopie
de l'Association Corporative
des
Etudiants en Médecine
de Lille.**