

50376  
1980  
226

50376  
1980  
226

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR 3<sup>e</sup> CYCLE**

par

Catherine MICHALSKI-SCRIVE

**ETUDES DES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE  
PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE  
ET SPECTROSCOPIE DIFFERENTIELLE**



Soutenue le 9 décembre 1980 devant la Commission d'Examen

Président	M.	C.	LOUCHEUX
Rapporteur	M.	G.	BISERTE
Membre invité	M <sup>le</sup>	M.	CHAMPAGNE
Examineurs	Mme	M.H.	LOUCHEUX
	M.	P.	SAUTIERE

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

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

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

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - 1ère Classe

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. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale

M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
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. LHOMME Jean	Chimie
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
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 - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale

M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUBRULLE Alain	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
Mme	EVARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	HOUDART René	Mathématiques
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEMAIRE Jean	Physique
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M.	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
Mle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M.	NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	PARSY Fernand	Mécanique
Mle	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PECQUE Marcel	Chimie Organique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	PORCHET Maurice	Biologie
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	RICHARD Alain	Biologie



M. RIETSCH François	Chimie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
Mme SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. SCHAMPS Joël	Physique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Chimie
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

X

Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Monsieur le Professeur G.BISERTE), dans les laboratoires de Madame M.H. LOUCHEUX et Monsieur P.SAUTIERE, Maîtres de Recherches au CNRS.

Monsieur le Professeur G.BISERTE a bien voulu m'accueillir à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et s'est toujours efforcé de trouver l'aide nécessaire à la bonne réalisation de ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et l'assure de mes sentiments respectueux.

Je tiens également à le remercier d'avoir bien voulu accepter d'être le rapporteur de cette thèse.

Monsieur C.LOUCHEUX, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Qu'il veuille bien accepter mes respectueux remerciements.

Madame M.H.LOUCHEUX, Maître de Recherches au CNRS m'a proposé le sujet de cette thèse et m'a initiée aux différentes techniques biophysiques. Elle m'a permis de mener à bien ce travail. Je lui adresse ici tous mes remerciements.

Monsieur P.SAUTIERE, Maître de Recherches au CNRS, m'a accueillie au sein du groupe "HISTONES" où j'ai pu réaliser la partie biochimique de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude pour les conseils et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués.

Mademoiselle M.CHAMPAGNE, Maître de Recherches au CNRS, m'a fait l'honneur de juger ce travail. Je la remercie très sincèrement.

*Je tiens également à exprimer ma sincère reconnaissance à tous ceux qui m'ont aidée et encouragée pendant la préparation de cette thèse.*

*Je remercie particulièrement Monsieur J.P.AUBERT pour l'aide, les nombreux conseils et les discussions que nous avons eues ensemble.*

*Monsieur M.COUPPEZ m'a fait partager ses compétences dans le domaine de la préparation et la séparation des histones. Je l'en remercie vivement.*

*C'est enfin de tout coeur que j'associe à ces remerciements Mesdames M.P.HILDEBRAND, A.HEMEZ, T.ERNOUT et Monsieur C.DENIS pour l'aide précieuse et efficace qu'ils ont apportée à la réalisation de ce travail ainsi que Madame M.T.GARET pour la réalisation photographique et Madame SAINLEGER pour l'impression de ce mémoire.*

*La Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique et l'Association pour le Développement de la Recherche sur le Cancer m'ont permis d'effectuer ce travail en m'accordant une allocation de Recherche. Je les en remercie.*

## ABREVIATIONS

A	: absorbance
DC	: dichroïsme circulaire
DFP	: diisopropylfluorophosphate
DNA	: acide désoxyribonucléoprotéique
ESR	: résonance de spin électronique
GuCl	: chlorhydrate de guanidine
NAC-Tyr-NH <sub>2</sub>	: N-acétyl-tyrosinamide
NaF	: Fluorure de sodium
RMN	: résonance magnétique nucléaire
RNA	: acide ribonucléique
S	: constante de Svedberg
SDS	: sodium dodécyl sulfate
TRIS	: tri-(hydroxyméthylaminométhane)
U.V.	: ultra-violet

## TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES	
<u>CHAPITRE 1</u>	
<u>ORGANISATION GENERALE DE LA CHROMATINE</u>	2
<u>1 - 1 EXISTENCE D'UNE UNITE DE REPETITION</u>	4
1 - 1-1 Les premiers arguments	4
1 - 1-2 Notion de nucléosome	5
<u>1 - 2 ASPECT STRUCTURAL DU NUCLEOSOME</u>	7
1 - 2-1 Forme et dimensions	7
1 - 2-2 Existence d'une symétrie	8
1 - 2-3 Variations de conformation	11
1 - 2-4 Variations de composition	12
<u>1 - 3 STRUCTURES D'ORDRE SUPERIEUR</u>	12
<u>1 - 4 STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE</u>	14
1 - 4-1 Structure de la chromatine et transcription	14
1 - 4-2 Structure de la chromatine et réplication	19
<u>CHAPITRE 2</u>	
<u>LES HISTONES</u>	22
<u>2 - 1 CARACTERISTIQUES</u>	22
2 - 1-1 Les différents types d'histones	22
2 - 1-2 Les données de la séquence	24

2 - 2	<u>ORGANISATION DES HISTONES DANS LA CHROMATINE</u>	29
2 - 2-1	Assemblage des histones	29
2 - 2-2	Nature des interactions	31
2 - 2-3	Localisation des régions d'interaction	33
2 - 3	<u>ROLE DES HISTONES DANS LA CHROMATINE</u>	36
2 - 3-1	Maintien dans la structure	36
2 - 3-2	Régulation de la fonction structurale	36
2 - 3-2-1	Modifications post-synthétiques	36
2 - 3-2-2	Interaction avec des NHP	38
2 - 3-2-3	Apparition de variations d'histones	38

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE 1

	<u>PREPARATION DES HISTONES ET DES COMPLEXES D'HISTONES - CARAC-</u> <u>TERES PHYSICO-CHIMIQUES DES HISTONES H2A ET H2B DE SEICHE</u>	40
1 - 1	<u>PREPARATION DES HISTONES</u>	41
1 - 1-1	Préparation de la chromatine	41
1 - 1-2	Extraction sélective des fractions d'histones	41
1 - 1-3	Isolement des histones de Veau	41
1 - 1-4	Isolement des histones de Seiche	43
1 - 1-5	Contrôle de pureté	45
1 - 2	<u>CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES HISTONES H2A ET H2B</u> <u>DE SEICHE</u>	48
1 - 2-1	Caractérisation	48
1 - 2-1-1	Comportement électrophorétique	48
1 - 2-1-2	Composition en acides aminés	49
1 - 2-2	Etude structurale	49
1 - 2-2-1	Séquence en acides aminés de l'histone H2A	51
1 - 2-2-2	Eléments de structure primaire de l'histone H2B	51

1 - 3	<u>PREPARATION DES COMPLEXES D'HISTONES</u>	54
1 - 3-1	Préparation du dimère H2A-H2B	54
1 - 3-2	Préparation du tétramère (H3-H4) <sub>2</sub>	54
1 - 3-3	Préparation de l'octamère	57

## CHAPITRE 2

	<u>ETUDE DES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE PAR DICHROISME CIRCULAIRE</u>	62
--	---	----

2 - 1	<u>METHODE DES VARIATIONS CONTINUES : RAPPELS HISTORIQUES</u>	63
2 - 1-1	Principe	63
2 - 1-2	Calcul de la constante d'association pour un mélange équimoléculaire	64
2 - 2	<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	66
2 - 2-1	Préparation des solutions	66
2 - 2-2	Mesures de dichroïsme circulaire	67
2 - 2-3	Extrapolation des pentes initiales	68
2 - 3	<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	69
2 - 3-1	Mise en évidence des interactions	69
2 - 3-1-1	Complexes homologues et hétérologues	69
2 - 3-1-2	Cas de l'histone H2B de Seiche	74
2 - 3-2	Calcul de la constante d'association	75
2 - 3-3	Variation de l'énergie libre lors de la formation des complexes	78
2 - 3-4	Limites de la méthode	79
2 - 4	<u>CONCLUSION</u>	80



### CHAPITRE 3

<u>ETUDE DES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE PAR SPECTROSCOPIE</u>	82
<u>DIFFERENTIELLE</u>	
3 - 1 <u>RAPPELS THEORIQUES</u>	83
3 - 1-1 Principe	83
3 - 1-2 Détermination du nombre de résidus tyrosine exposés	83
3 - 2 <u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	84
3 - 2-1 Préparation des solutions	84
3 - 2-2 Mesures de l'absorption différentielle	84
3 - 3 <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	85
3 - 3-1 Spectres différentiels du composé modèle	85
3 - 3-2 Application de la méthode aux histones et complexes d'histones	88
3 - 3-2-1 Analyse des spectres	88
3 - 3-2-2 Conformation des histones	89
3 - 3-2-3 Conformation des complexes d'histones	97
3 - 4 <u>CONCLUSION</u>	108
<u>CONCLUSION</u>	110
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	112
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	

I N T R O D U C T I O N



Dans les cellules des Eucaryotes, le DNA se trouve associé à un grand nombre de protéines ainsi qu'à une faible quantité de RNA en un ensemble complexe appelé CHROMATINE. Si le DNA contient toutes les informations nécessaires à la vie d'un organisme, les protéines jouent pour leur part un rôle essentiel en maintenant la structure de ce DNA et en contrôlant l'expression des gènes. Le contrôle de l'activité des gènes est essentiel pour des processus aussi fondamentaux que la différenciation ou pour des processus anormaux tels que le cancer.

Un groupe de protéines chromosomales joue un rôle particulièrement important dans la structure du matériel génétique : ce sont les HISTONES. Ces protéines organisent le DNA en particules fondamentales communes à toutes les chromatines et appelées NUCLEOSOMES. La structure nucléosomale est maintenue à la fois par des interactions du DNA avec les histones mais surtout par des interactions entre les histones elles-mêmes. Il apparaît donc intéressant de préciser la nature et le site des interactions histone-histone afin de connaître les mécanismes impliqués dans les variations structurales de la chromatine, qui accompagnent les phénomènes de régulation.

Grâce à la connaissance parfaite de leur structure primaire, les histones constituent en outre un matériel particulièrement intéressant pour l'étude plus générale des interactions protéine-protéine.

C'est dans cette double perspective, biologique et physico-chimique, que nous avons abordé l'étude des interactions histone-histone.

Deux techniques de biophysique ont été utilisées : le dichroïsme circulaire et la spectroscopie différentielle. Ces deux méthodes complémentaires permettent d'obtenir des renseignements sur la conformation des histones prises individuellement et sur les changements de conformation intervenant lors de l'assemblage des histones. Les études de dichroïsme circulaire ont été effectuées plus particulièrement sur des complexes H2A-H2B formés à partir d'histones provenant d'une même espèce ou d'espèces différentes, afin d'étudier une éventuelle spécificité d'interaction des histones entre elles.



PREMIERE PARTIE

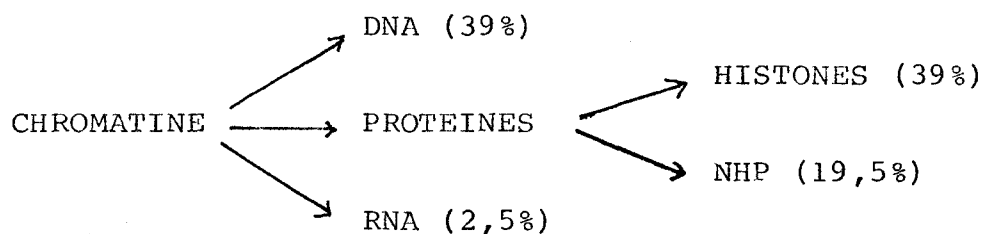
GENERALITES

## CHAPITRE 1

## ORGANISATION GENERALE DE LA CHROMATINE

Dans la chromatine, le DNA est associé à des protéines que l'on peut classer en deux groupes : les HISTONES, pour lesquelles le rapport histones/DNA est généralement proche de 1 et les PROTEINES NON HISTONES ou NHP qui existent en quantité beaucoup plus variable et pour lesquelles le rapport NHP/DNA est compris entre 0,5 et 1,5 selon le tissu ou l'espèce considéré (39).

La composition globale de la chromatine de thymus de Veau est rappelée ci-dessous (126) :



Les HISTONES se distinguent nettement des autres protéines chromosomales :

- elles sont fortement basiques (30 p.100 des résidus sont des lysines ou des arginines).
- elles existent en grande quantité. Le rapport histones/DNA est généralement constant. Des études rigoureuses ont montré toutefois que dans des cas particuliers ce rapport pouvait varier considérablement (55,89,144). Il peut ainsi atteindre la valeur de 3 dans des systèmes génétiquement dormants tels que les graines (55) ou les cellules complètement différenciées (89).

- elles se répartissent en cinq classes : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Elles existent sauf H1, en quantité à peu près équimoléculaire (2,98). Les érythrocytes nucléés des oiseaux, des poissons, des reptiles et des batraciens renferment en outre une histone particulière : l'histone H5, qui présente des caractéristiques proches de celles de l'histone H1.

Le rôle des histones dans la chromatine est essentiel. Les histones sont des protéines de structure qui maintiennent le DNA dans une conformation déterminée. Elles ne présentent apparemment aucune spécificité vis-à-vis d'une séquence nucléotidique donnée (90,107). Il apparaît toutefois de plus en plus que leur rôle dans la chromatine n'est pas entièrement passif. Les caractéristiques des différentes histones et ce que l'on connaît de leur organisation et de leur rôle dans la chromatine sont présentés dans le chapitre suivant.

Les autres protéines chromosomales, les PROTEINES NON HISTONES, forment un groupe beaucoup plus hétérogène. On en a dénombré environ 150 qui varient selon le tissu ou l'espèce considéré. Un grand nombre d'entre elles n'existe qu'en très petite quantité et pendant longtemps, ces protéines sont restées peu étudiées.

Plusieurs sont cependant connues. Certaines possèdent une activité biologique : ce sont des enzymes agissant sur le DNA (polymérases, endonucléases, déroulases...) ou sur les protéines (acétylases, kinases, méthylases). Des récepteurs d'hormones thyroïdiennes (68) ainsi que d'hormones stéroïdes (29) ont également été identifiés dans la chromatine.

D'autres protéines non histones participent à l'organisation de la structure de la chromatine. Des protéines contractiles telles que l'actine, la myosine, la tropomyosine et la tubuline (35) ont été mises en évidence. On a pu également constater que certaines NHP étaient capables de se lier au DNA; les unes pour le destabiliser (30), ce qui constituerait une étape préalable à son expression, les autres au contraire pour

le stabiliser (158). Les protéines de type HMG (high mobility group) font partie de ce dernier groupe. Chez les Mammifères, il existe quatre protéines HMG majeures : HMG-1, HMG-2, HMG-14 et HMG-17. Des protéines comparables ont été isolées chez la truite. Elles stabilisent la double hélice du DNA vis-à-vis de la dénaturation thermique (158). Les HMG-1 et 2 interagissent de plus avec l'histone H1 (123,159).

Un des buts de la biologie est de comprendre comment tous ces constituants s'organisent en un ensemble fonctionnel. La découverte d'une unité de répétition puis la mise en évidence du nucléosome a constitué une étape importante dans l'élucidation de la structure de la chromatine.

## 1 - 1 EXISTENCE D'UNE UNITE DE REPETITION

### 1 - 1 - 1 Les premiers arguments

Les premiers arguments en faveur d'une unité de répétition dans la chromatine proviennent des études de diffusion du rayonnement X sur les noyaux des cellules. Par cette technique en effet, WILKINS *et al* (154) purent observer dès 1956 des spectres présentant des séries régulières de bandes de diffusion, ne pouvant s'expliquer que par l'existence d'une unité de répétition. Sur des complexes DNA-histones, ce même diagramme de diffusion fut obtenu un peu plus tard (79). Des études d'accessibilité enzymatique révélant par ailleurs, que le DNA était recouvert de protéines, on supposa à cette époque le DNA enroulé en une super-hélice pontée par des histones, le pas de la super-hélice formant l'unité de répétition (104,161).

Ce modèle fut généralement accepté jusqu'en 1974, date à laquelle apparut la notion de nucléosome.

## 1 - 1-2 Notion de nucléosome

Des études par digestion à la nucléase de Staphylocoque montrèrent tout d'abord que le DNA n'était pas uniformément recouvert de protéines. Il existe des sites sensibles à l'action de l'endonucléase et régulièrement espacés (58).

A la même époque, en microscopie électronique, WOODCOCK (155), puis OLINS (99) observèrent des particules sphériques de 60 à 80 Å de diamètre, disposées linéairement à la manière de "perles sur un fil". Ces mêmes particules furent observées peu après sur une chromatine dépourvue d'histone H1 (Figure 1) et purent être reconstituées *in vitro* à partir de DNA et des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 (100).

Tenant compte des propriétés associatives des histones (27,67) et de leur stoechiométrie dans la chromatine, KORNBERG proposa une organisation en octamère pour les histones H2A, H2B, H3 et H4 (66); l'octamère comportant deux fois chacune des quatre molécules.

La mise au point de la technique de diffusion des neutrons enfin a permis à BALDWIN (9) de montrer que la série régulière de bandes de diffusion obtenue en rayons X était due, non pas au DNA comme l'avaient laissé suggérer les premières études sur la chromatine, mais bien à une distribution régulière des protéines. Ces observations devaient être décisives pour l'acceptation définitive du concept de nucléosome comme unité structurale de base dans la chromatine.

Ainsi, par digestion poussée à la nucléase de Staphylocoque, on définit dans tous les types de cellules étudiées jusqu'à présent, une particule nucléosomique élémentaire appelée "core particle", contenant toujours 146 paires de bases de DNA (32) et l'octamère des quatre histones H2A, H2B, H3 et



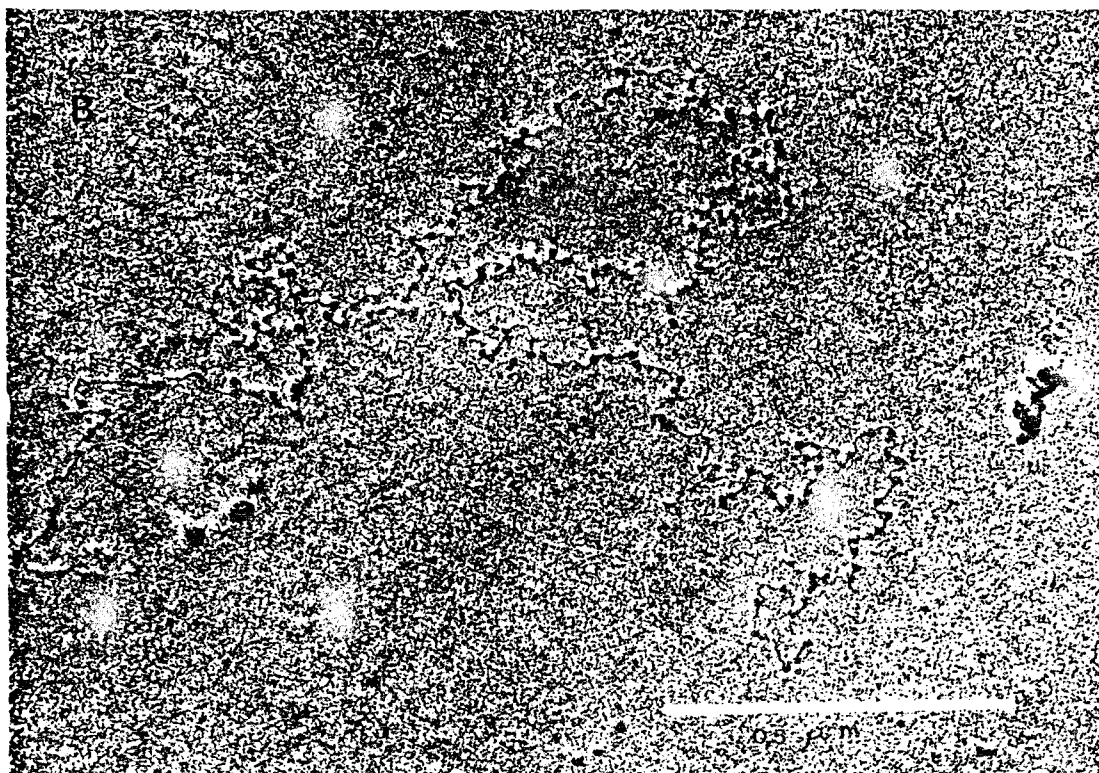


FIGURE 1 - CHROMATINE APRES DIGESTION TRYPSIQUE DE L'HISTONE HI  
OUDET *et al* (1975) Cell 4 , 281-300.

H4. Le DNA non inclus dans la "core particle", de longueur variable selon le tissu ou l'espèce considéré (94,112,115,124), forme le DNA internucléosomique ou DNA "linker".

La cinquième histone, l'histone H1 interagit avec les "core particles" (12,14,47,56,111), en particulier avec l'histone H2A (14). Elle interagit également avec le DNA mais ne fait pas partie intégrante de la "core particle" (8,153). L'ensemble "core particle", DNA "linker" et histone H1, constitue le nucléosome.

## 1 - 2 ASPECT STRUCTURAL DU NUCLEOSOME

En traitant la chromatine par la nucléase de Staphylocoque, on peut isoler, puis analyser les nucléosomes ou les "core particles". Des détails ont ainsi été obtenus sur la forme, les dimensions et la structure globale des histones et du DNA dans la particule nucléosomique élémentaire. Des études physico-chimiques menées sur le nucléosome ont démontré l'existence de variations de conformation de ce dernier en fonction d'agents physiques ou chimiques divers. Nous signalons également dans ce paragraphe que par digestion brève de la chromatine par la nucléase de Staphylocoque, on peut recueillir des formes de mononucléosomes auxquels se trouvent associées des protéines supplémentaires. Le rôle de ces protéines sur la structure des nucléosomes reste mal connu.

### 1 - 2-1 Forme et dimensions

Des détails sur la forme et les dimensions de la "core particle" ont été obtenus par cristallographie. FINCH *et al* (43) en effet ont réussi à cristalliser et analyser aux rayons X des "core particles".

Le diagramme de diffusion obtenu à partir des cristaux a permis de conclure que la particule n'était pas sphérique mais

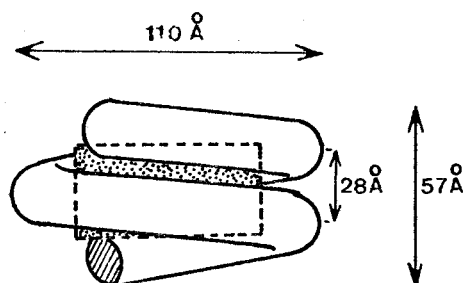
se présentait plutôt sous la forme d'un cylindre plat de 110 Å de diamètre et de 57 Å de hauteur. Les histones situées à l'intérieur s'associent à un tour trois quarts d'une super-hélice de DNA ayant un pas de 28 Å (Figure 2) ; un tour d'hélice correspond à 80 paires de bases. Ces dimensions, obtenues par cristallographie, confirmaient celles déterminées par les techniques de microscopie électronique (71), de diffusion des neutrons (9,106), de diffusion des rayons X (105).

### 1 - 2-2 Existence d'une symétrie

Une caractéristique structurale importante du nucléosome est l'existence d'un axe de symétrie. On peut le mettre en évidence dans la "core particle" par les techniques enzymatiques et physiques.

Les nucléases, en effet, agissent non seulement sur le DNA "linker" mais à vitesse plus faible sur le DNA de la "core particle" (Tableau I). L'identification des fragments obtenus après digestion enzymatique permet d'obtenir des renseignements sur l'organisation interne des particules.

La DNase I par exemple, fournit une série de fragments de DNA dont les longueurs, exprimées en nombre de paires de bases, sont des multiples de 10 (95). L'intensité des bandes obtenues sur gel indique que tous les sites de clivage ne sont pas également accessibles à l'enzyme. Par marquage radioactif, il est possible de repérer leur position relative. Différents laboratoires (78,121) ont pu ainsi montrer que les régions de faible accessibilité à la DNase I se regroupaient de façon symétrique par rapport à un axe. Par cristallographie, FINCH *et al* (43) ont confirmé ces observations. Se basant sur les résultats précédemment acquis, les auteurs ont présenté un modèle permettant de rendre compte de l'action spécifique des DNases sur la "core particle" (Figure 3).



La protéine est représentée comme un cylindre de 70 Å de diamètre et 35 Å de hauteur

Le DNA s'enroule autour de la protéine en 1 tour 3/4 de super-hélice de DNA ayant un pas de 28 Å.

FIGURE 2 - Forme et dimensions de la "core particle" d'après les résultats de FINCH *et al* (43) et PARDON *et al* (105).

TATCHELL, K et VAN HOLDE, K.E. (1978) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 3583-3587.

Les sites distants de 80 paires de bases sont proches. Les régions de faible accessibilité à la DNase I se regroupent symétriquement dans les zones hachurées. Les flèches indiquent la position de l'axe de dyade.

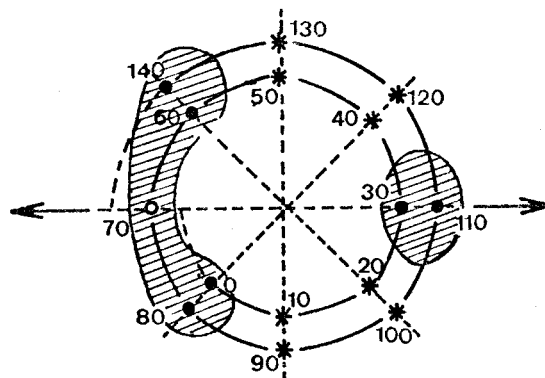


FIGURE 3 - Action des nucléases sur la "core particle" FINCH *et al* (1977), Nature, 269, 29-36.

TABEAU I

NUCLEASES UTILISEES POUR LES ETUDES DE STRUCTURE DE LA CHROMATINE (90)

	NUCLEASE MICROCOCCALE EC 3.1.4.7	DNase II EC 3.1.4.6	DNase I EC 3.1.4.5
AUTRE NOM	Nucléase staphylococcale	DNase de rate	DNase pancréatique
SUBSTRAT	DNA simple brin >>> double brin	DNA double brin >> simple brin	DNA double brin > simple brin
ATTAQUE SUR LES POLYNUCLEOSOMES	DNA "linker" >>> DNA "core"	DNA "linker" ou DNA "core" ou DNA "linker" et "core"	DNA "linker" et "core"
CLIVAGE SUR LES POLYNUCLEOSOMES	Digestion brève : fournit le nucléosome  Digestion poussée : fournit la "core particle"	Fournit des fragments de 100 x n paires de bases  Sépare chromatine active et inactive	Dégrade plus rapidement la chromatine active.
CLIVAGE SUR LES "CORE PARTICLES"	Fournit des fragments de 10 x n paires de bases		



Il existe également un site préférentiel de clivage au milieu du nucléosome. Dans certaines conditions de force ionique et en présence d'histone H1, la DNase II fournit en effet des fragments de DNA contenant 100 paires de bases ou des multiples de 100. Ce site n'est présent que dans des oligomères de nucléosomes ou dans la chromatine (5).

L'existence d'une certaine symétrie dont la "core particle" et dans le nucléosome a conduit WEINTRAUB *et al* à émettre l'hypothèse selon laquelle le nucléosome serait capable de s'ouvrir en deux demi-nucléosomes symétriques (150). Cette hypothèse est appuyée par des observations en microscopie électronique (101) et des études d'interaction entre les histones en absence de DNA (149). Ce type de structure ouverte permettrait d'expliquer les phénomènes de réplication et de transcription dans un système de chromatine où le nucléosome ou du moins une structure type nucléosome subsiste.

### 1 - 2-3 Variations de conformation

Des études physico-chimiques diverses, menées sur des nucléosomes isolés, ont mis en évidence la possibilité de variations de conformation qui pourraient correspondre à différents états fonctionnels dans la chromatine.

L'effet de divers agents tels les solvants organiques et le pH (130,160), l'urée (97), la température et le force ionique (53,125), permet de mettre en évidence des transitions dans la conformation des nucléosomes. Ces transitions se traduisent par des variations des propriétés hydrodynamiques et optiques : elles affectent la structure globale du nucléosome au niveau du DNA (203) et au niveau des histones. Les variations de conformation des histones dans le nucléosome peuvent être mises en évidence par l'intermédiaire de sondes moléculaires vis-à-vis desquelles les histones réagissent différemment suivant leur type et les conditions utilisées (1,8,16,19, 152).

Le nucléosome peut présenter trois conformations distinctes en fonction de la force ionique (53) :

- une conformation "ouverte" au-dessous d'une concentration en chlorure de potassium de 0,7 mM.

- une conformation intermédiaire pour une concentration comprise entre 2 et 5 mM.

- une conformation compacte à partir d'une concentration de 11 mM.

#### 1 - 2-4 Variations de composition

Une certaine hétérogénéité existe parmi les "mononucléosomes" obtenus après digestion à la nucléase micrococcale. Des formes électrophorétiques différentes sont ainsi produites après digestion enzymatique (7,74,141). Elles diffèrent non seulement par la longueur de DNA qu'elles contiennent, mais également par la présence ou non de protéines H1 et HMG (74). Des proportions variables des différentes histones pourraient être également responsables de l'hétérogénéité électrophorétique des nucléosomes (2).

#### 1 - 3 STRUCTURES D'ORDRE SUPERIEUR

Des fibres épaisses de 250 à 300 Å de diamètre peuvent être observées sur des préparations de noyaux, suggérant que la chromatine présente normalement un niveau d'organisation supérieur à celui des nucléosomes (28).

Ces fibres épaisses ne sont observées qu'à force ionique élevée et en présence de l'histone H1 (110).

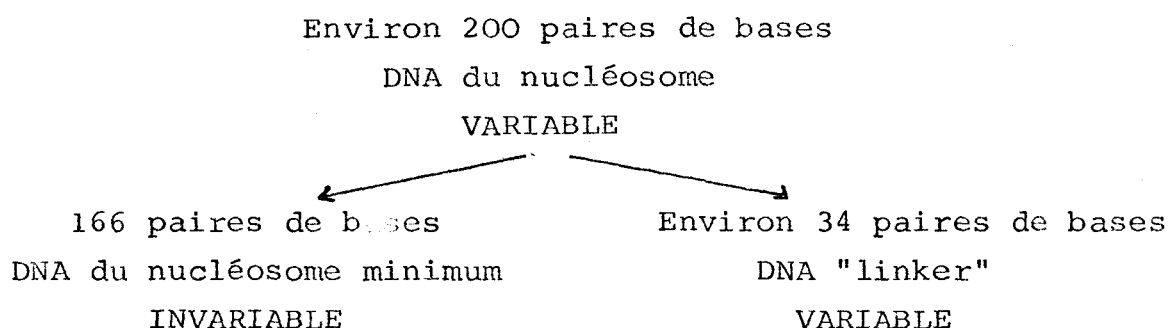
FINCH et KLUG (42) ont proposé en 1976 un enroulement du nucléofilament en une superstructure solénoïdale d'un diamètre de 300 Å et d'un pas de 110 Å environ, comprenant 6 à 8 nucléosomes par tour.

Plus récemment, tenant compte de différentes observations, THOMA *et al* (135) ont proposé un modèle de chromatine montrant comment, en fonction de la force ionique, celle-ci se condensait progressivement en une structure de plus en plus compacte (Figure 4A). A partir d'une concentration en sel de 1 mM, le filament de nucléosome se plie en des structures intermédiaires hélicoïdales différant par le nombre de nucléosomes par tour. A 60 mM, il se forme une fibre épaisse de 250 Å de diamètre correspondant au solénoïde de FINCH et KLUG (42). La chromatine sans H1 se condense également en fonction de la force ionique mais d'une façon moins dense et en une structure beaucoup moins bien définie.

Selon THOMA *et al*, l'histone H1 se lierait avec 10 paires de bases de DNA de chaque côté de la "core particle", permettant ainsi la formation de deux tours complets de super-hélice de DNA (au lieu de un tour trois quarts sans histone H1) (Figure 4B).

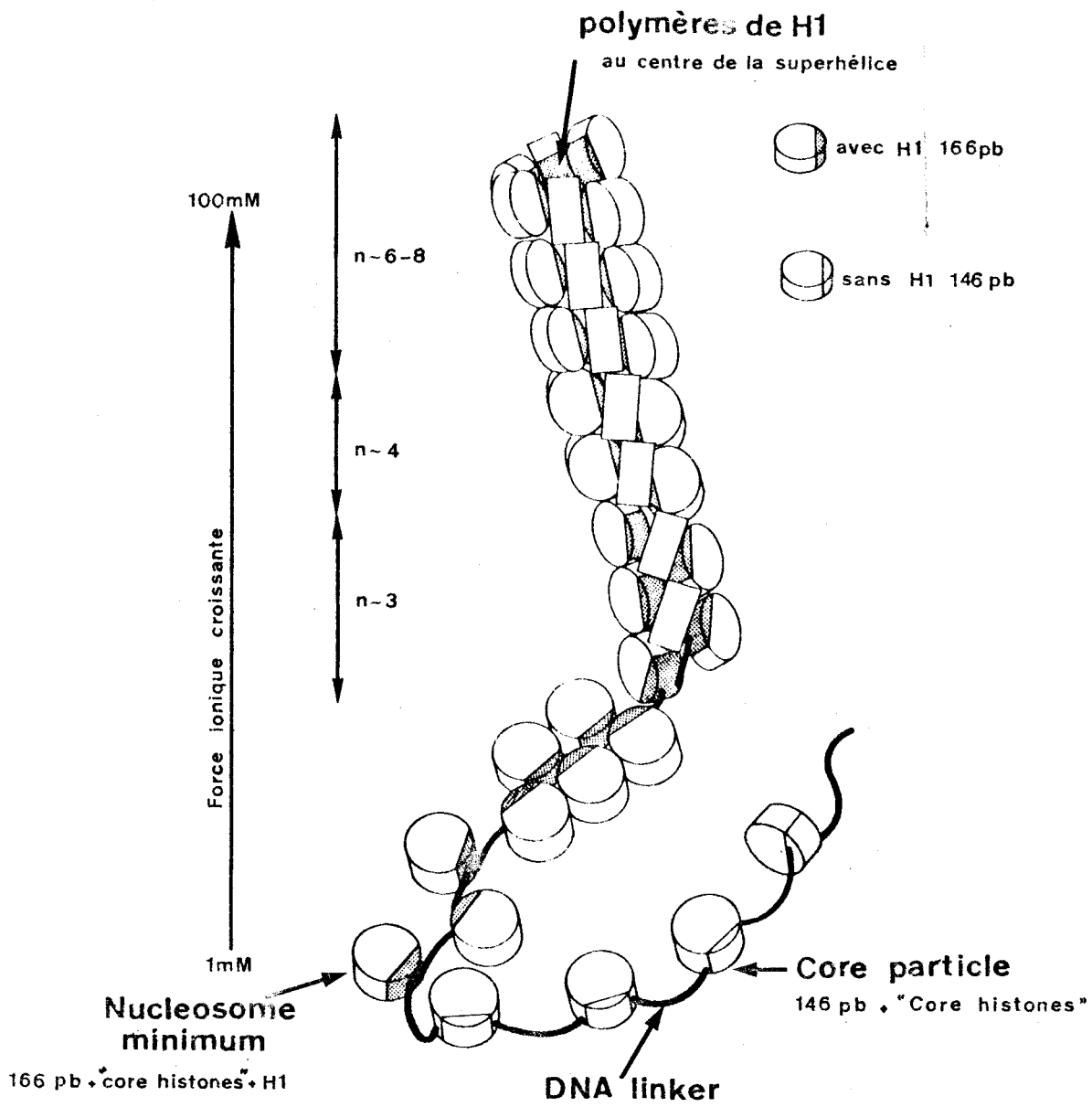
Lors de la formation des structures d'ordre supérieur, les régions où se localise l'histone H1, viendraient à proximité l'une de l'autre de façon à ce que des polymères de H1 se forment au centre des structures.

Les résultats obtenus par les auteurs ont amené ces derniers à redéfinir les proportions de DNA dans le nucléosome de la manière suivante :

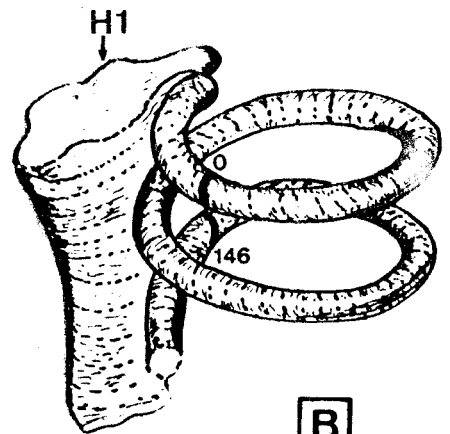


L'octamère des "core histones", l'histone H1 et les 166 paires de bases de DNA organisées en deux tours complets de super-hélice, constitueraient selon THOMA *et al* (135) un nucléosome minimum, particule fondamentale commune à toutes les chromatines.





**A**



**B**

Figure 4

Assemblage des nucléosomes



## 1 - 4 STRUCTURE DE LA CHROMATINE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE

Les paragraphes précédents ont décrit la structure de la chromatine sans que soit précisé son état fonctionnel. Or, depuis qu'est établie la notion de nucléosome, un certain nombre d'études visent maintenant à établir la relation entre structure et activité biologique. Les questions fondamentales concernant l'activité biologique de la chromatine restent en effet à élucider. Quelle est, par exemple, la structure qui détermine dans une cellule différenciée l'expression sélective de certaines régions du DNA et la répression de certaines autres ? Cette restriction de l'activité "template" du DNA est liée au moins en partie à la régulation de la transcription. Quelle est la structure de la chromatine au cours de la transcription ou lors de la réplication ? On peut se demander si le nucléosome tel que nous l'avons décrit dans les paragraphes précédents constitue ou non un état permanent de la chromatine.

### 1 - 4-1 Structure de la chromatine et transcription

Un certain nombre de méthodes ont été utilisées pour étudier la structure de la chromatine active :

- Utilisation des nucléases sur des gènes spécifiques
- Isolement des régions actives de la chromatine
- Expériences d'hybridation du DNA nucléosomal
- Etudes de microscopie électronique.

Chaque méthode donne des aspects différents de la structure de la chromatine active. Quelques fois, deux méthodes donnent des résultats contradictoires.

#### 1 - 4-1-1 Utilisation des nucléases sur des gènes spécifiques

Les différentes nucléases décrites précédemment (Tableau I) ont également été utilisées sur la chromatine afin de détecter d'éventuelles caractéristiques structurales des régions actives.

La nucléase staphylococcale tout d'abord ne semble pas détecter de caractéristique structurale particulière des régions actives par rapport à la chromatine totale. Dans les réticulocytes par exemple, les gènes de la globine sont protégés de la digestion complète (6,148) ou partielle (69) par la nucléase de staphylocoque au même degré que l'est la chromatine totale. Des résultats semblables ont été obtenus sur les gènes de l'ovalbumine dans l'oviducte (45). Ces résultats permettent de penser que le DNA actif se trouve impliqué dans des structures ayant la même unité de répétition que le nucléosome.

La DNase I cependant a sur la chromatine un comportement très différent de celui de la nucléase de staphylocoque. En effet, cette enzyme détruit préférentiellement les fragments de DNA transcrits dans un tissu donné. Après que 10 à 20 p.100 du DNA de la chromatine ait été digéré, on peut montrer qu'il manque parmi le DNA restant, les séquences des gènes spécifiques actifs dans le tissu étudié. Ainsi la digestion de 10 p.100 du DNA dans le réticulocyte touche le gène de la globine alors que le gène de l'ovalbumine reste intact. Le même traitement appliqué à l'oviducte détruit le gène de l'ovalbumine sans toucher les gènes non exprimés dans cet organe (45,148). Le fait que la DNase I dégrade plus rapidement les séquences actives indique clairement une différence de conformation entre les régions actives et inactives de la chromatine.

On ne peut pas attribuer à l'absence de protéines la susceptibilité particulière des gènes actifs à la DNase I car les mêmes séquences qui sont digérées par cette enzyme sont résistantes à la nucléase de staphylocoque. Pour expliquer les résultats obtenus avec ces deux enzymes, WEINTRAUB et GROUDINE (148) ont proposé pour la chromatine active, une structure

type nucléosomale où le DNA se trouverait particulièrement exposé à l'action de la DNase I sans que la nucléase de staphylocoque ne détecte de différences.

La DNase II enfin semble détecter des caractéristiques structurales différentes entre régions active et inactive. Après action de l'enzyme, on peut en effet séparer les deux types de régions (146). Contrairement à la DNase I qui dégrade complètement les séquences actives du DNA, la DNase II présente l'avantage de préserver la structure de ces séquences. La DNase II a été utilisée pour isoler les régions actives de la chromatine.

#### 1 - 4-1-2 Isolement de la chromatine active et étude structurale

Le fait de pouvoir isoler les régions actives de la chromatine constitue une étape importante dans l'élucidation de leur structure.

La chromatine totale est digérée par la DNase II. Le surnageant obtenu après centrifugation différentielle est fractionné par traitement avec une solution de chlorure de magnésium. La fraction soluble contient une chromatine présentant tous les critères qui caractérisent la chromatine active : présence de RNA naissant, hybridation du RNA cellulaire total, complexité faible des séquences de DNA (54).

Cette méthode de fractionnement a été appliquée avec succès à l'isolement du gène de la globine dans le système cellulaire de la leucémie érythroblastique de FRIEND (146). Ce système cellulaire est intéressant car il est possible d'induire l'expression du gène de la globine par un certain nombre de petites molécules, en particulier par le diméthyl sulfoxyde (DMSO). Lorsque les cellules sont stimulées par le DMSO, la fraction de chromatine soluble dans le chlorure de magnésium contient les séquences du gène de la globine. Lorsque l'expérience est réalisée sur des cellules ne synthétisant jamais la globine, la fraction de chromatine soluble ne renferme aucune

séquence de ce gène. Il est intéressant de noter que même lorsque les cellules de FRIEND ne sont pas stimulées par le DMSO et donc ne synthétisent pas le mRNA de la globine, la fraction soluble contient les séquences de ce gène.

Ces expériences suggèrent que la DNase II sépare deux catégories de séquences de DNA, celles qui sont effectivement exprimées ou dont on peut induire l'expression et celles qui ne sont jamais exprimées ou dont on ne peut pas induire l'expression.

Les fractions contenant la "chromatine active" ont été isolées et étudiées. GOTTFELD et son équipe (54) ont montré qu'elles contenaient des "nucléosomes". Ces derniers sont cependant différents de ceux obtenus généralement à partir d'une chromatine non fractionnée. Leur constante de sédimentation en particulier est plus forte : 14 S au lieu de 12 S. Du RNA et des NHP apparaissent en outre associés à ces structures.

#### 1 - 4-1-3 Expériences d'hybridation du DNA nucléosomal

Un autre type d'études de la chromatine active a consisté à isoler les nucléosomes par action de la nucléase de staphylocoque afin de détecter si les nucléosomes contenaient ou non des séquences de DNA actif. De telles séquences ont été repérées selon le système cellulaire utilisé, par hybridation avec les mRNA cellulaires totaux (140), les cDNA spécifiques (6,69,148) ou les rRNA (109). Les résultats ont montré que dans chaque cas, il y avait hybridation du DNA nucléosomal. Ces résultats semblent donc en accord avec l'existence des nucléosomes dans la chromatine active. Selon certains auteurs toutefois (108,109), la densité des nucléosomes serait plus faible dans ces régions actives.

#### 1 - 4-1-4 Etudes de microscopie électronique

Les régions actives de la chromatine ont également été observées en microscopie électronique. Les études se sont portées tout d'abord sur les gènes des RNA ribosomaux car ceux-ci sont aisément visualisés. Les résultats obtenus ont été assez surprenants. En effet, aucun nucléosome n'est jamais observé au niveau

des gènes en cours de transcription. En outre, des mesures sur la longueur du DNA transcrit ont montré que celui-ci était à peine moins étendu qu'un DNA libre ; ce qui semble exclure toute compaction du DNA actif dans une structure nucléosomale (81).

Les mêmes types d'observations ont été faites sur les gènes non ribosomiaux. Lors du développement de l'oeuf de *Xaenopus laevis*, les nucléosomes ne sont jamais observés dans les régions activement transcrites. Ils apparaissent par contre lorsqu'une région de la chromatine devient inactive (118). Toutefois, certains auteurs (44,80) ont obtenu des photos de microscopie électronique en accord avec l'existence de nucléosomes dans la chromatine active. Mc KNIGHT *et al* (80) ont même démontré que les structures observées contenaient des histones car elles réagissaient notamment avec des anticorps anti-H2B et anti-H3.

#### 1 - 4-1-5 Conclusion

Les observations de microscopie électronique sont donc en apparente contradiction avec les résultats obtenus par les autres techniques. Il est vrai que toute méthode d'étude peut interférer avec la structure native et figer l'ensemble de la préparation.

D'une manière générale toutefois, la majorité des auteurs semblent admettre l'existence d'une structure de type nucléosomale tout le long du DNA, y compris le long des séquences de DNA activement transcrites. Ceci établi, les mécanismes qui permettent ou répriment la transcription, restent encore à élucider. Il en est de même des caractéristiques structurales qui définissent les régions activement transcrites. Dans ce domaine, seules des hypothèses peuvent être proposées : le fait essentiel est que des protéines, vraisemblablement des histones, restent associées au DNA, même dans les régions actives.

Certains auteurs ont suggéré que les modifications par acétylation des résidus basiques des histones permettraient de lever localement et de façon réversible la répression du DNA (4).

Ce type de modification, ainsi que nous le verrons plus loin, affecte les régions d'interaction histone-DNA. Elle ne concerne pas les régions d'interaction des histones entre elles, fondamentales dans le maintien de la structure nucléosomale.

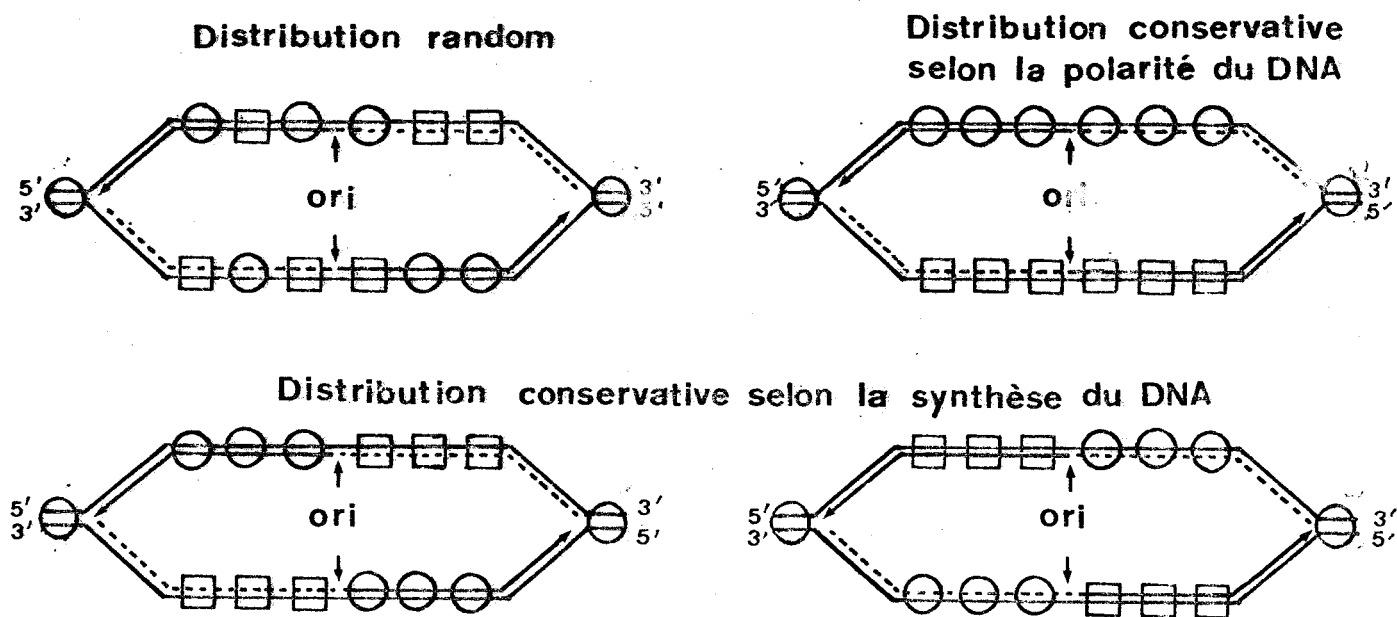
Il est possible d'envisager également une ouverture du nucléosome en deux demi-nucléosomes (150). Un tel mécanisme faciliterait la transcription sans que les histones soient détachées du DNA.

Enfin, les modifications qui se produisent dans la composition de la chromatine (présence de RNA, de NHP) peuvent avoir un rôle sur l'activité des gènes (25). Ces composés supplémentaires pourraient affecter la formation des structures d'ordre supérieur, la conformation ou la mobilité des mononucléosomes, afin de permettre l'expression sélective de certaines régions du DNA.

#### 1 - 4-2 Structure de la chromatine et réplication

Lors de la réplication, on sait qu'il y a tout d'abord déroulement du DNA nucléosomal par les déroulases, puis synthèse des nouvelles séquences de DNA à partir des deux brins du DNA parental et enfin réassemblage des nucléosomes au-delà de la fourche de réplication. La synthèse du DNA est continue sur une branche de la fourche de réplication, elle est discontinue sur l'autre (segments d'OKAZAKI).

Un certain nombre de travaux ont démontré que les huit molécules d'histones présentes dans un octamère restaient associées au cours de la réplication (73). Il est probable que les octamères préexistants soient transférés (125,131), intacts, sur l'une des molécules de DNA nouvellement synthétisées alors que les nouvelles histones s'associeraient à la seconde molécule de DNA nouvellement synthétisée. On ne sait pas encore si les octamères préexistants et néosynthétisés sont distribués de façon "random" ou conservative le long des deux branches de la fourche de réplication (Figure 5).



**FIGURE 5** - Quatre distributions possibles des octamères pré-existants (○) et néosynthétisés (□) sur les deux branches de la fourche de réplication. La synthèse du DNA s'effectue dans le sens 5' → 3' de façon continue sur l'une des branches (→), de façon discontinue sur l'autre branche (----) à partir de l'origine de réplication (ori) (33).



Les nouvelles molécules de DNA s'associent aux histones en des particules semblables mais non identiques aux nucléosomes matures. Ces particules différencieraient des nucléosomes matures par leur structure et la longueur du DNA "linker" (24). Elles subiraient en outre un processus de maturation (156), la réplication se poursuivant par ailleurs.

## CHAPITRE 2

### LES HISTONES

Les premières protéines chromosomales isolées et purifiées furent les histones. Elles ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Leurs caractéristiques, leur organisation et leur fonction dans la chromatine sont présentées dans ce deuxième chapitre.

#### 2 - 1 CARACTERISTIQUES

##### 2 - 1-1 Les différents types d'histones

Les histones se répartissent ainsi que nous l'avons vu plus haut en cinq classes : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Le tissu de référence est généralement le thymus de Veau (tableau II

- Les différentes histones sont toutes fortement basiques. A la différence de certaines protéines chromosomales non histones de type HMG également basiques, les histones contiennent relativement peu de résidus acides : le rapport basiques/acides est en effet supérieur à 1,5.

- Leur masse moléculaire est comprise entre 11.000 et 21.000.

- Elles renferment peu de résidus aromatiques : en particulier elles ne contiennent pas de tryptophane.

- Elles ne contiennent pas de cystéine, sauf l'histone H3 qui en renferme un ou deux résidus suivant les espèces et l'histone H4, chez les Echinodermes, qui en renferme un résidu.

TABLEAU II

## CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES HISTONES DE THYMUS DE VEAU

Nomenclature	H1	H2A	H2B	H3	H4
Masse moléculaire	21.000	14.005	13.774	15.324	11.282
Nombre de résidus	212	129	125	135	102
Rapport Basiques/Acides	5,90	1,50	1,93	1,65	2,45
Rapport Lysine/Arginine	15,25	1,16	2,50	0,72	0,78
Rapport Tyrosine/Phénylalanine	1	3	2,5	0,75	2
Rapport Isoleucine/Leucine	0,25	0,37	1	0,58	0,75

- Elles se distinguent l'une de l'autre d'après un certain nombre de critères :

- . leur solubilité,
- . leur migration électrophorétique,
- . leur analyse en acides aminés. Le rapport lysine/arginine est particulièrement intéressant à considérer. Il permet de distinguer H1, très riche en lysine, de H2B riche en lysine et de H2A, H3, H4 riches en arginine.

- . les rapports tyrosine/phénylalanine, isoleucine/leucine constituent également de précieux critères pour la caractérisation des histones, notamment en ce qui concerne les histones H2A et H2B.

Dans certains cas, la détermination de la séquence seule, permet de classer sans équivoque, l'histone étudiée. En effet, pour chaque type d'histone, il existe des séquences bien caractéristiques qui se retrouvent quelle que soit l'origine de l'histone étudiée.

## 2 - 1-2 Les données de la séquence

Deux types de renseignements ont été obtenus :

- La répartition asymétrique des résidus basiques et hydrophobes a permis de définir des domaines fonctionnels distincts le long de la chaîne polypeptidique.

- La détermination des séquences d'histones provenant d'espèces différentes a permis de mettre en évidence les régions variables et conservées au cours de l'évolution, mettant ainsi en lumière le rôle fondamental des structures conservées dans l'architecture moléculaire de la chromatine.

La figure 6 présente la distribution des résidus basiques, acides et hydrophobes le long de la chaîne peptidique dans les différents types d'histones, ainsi que le degré de conservation des séquences de ces histones (voir les revues générales d'ISENBERG (60) et de VON HOLT *et al* (143)).

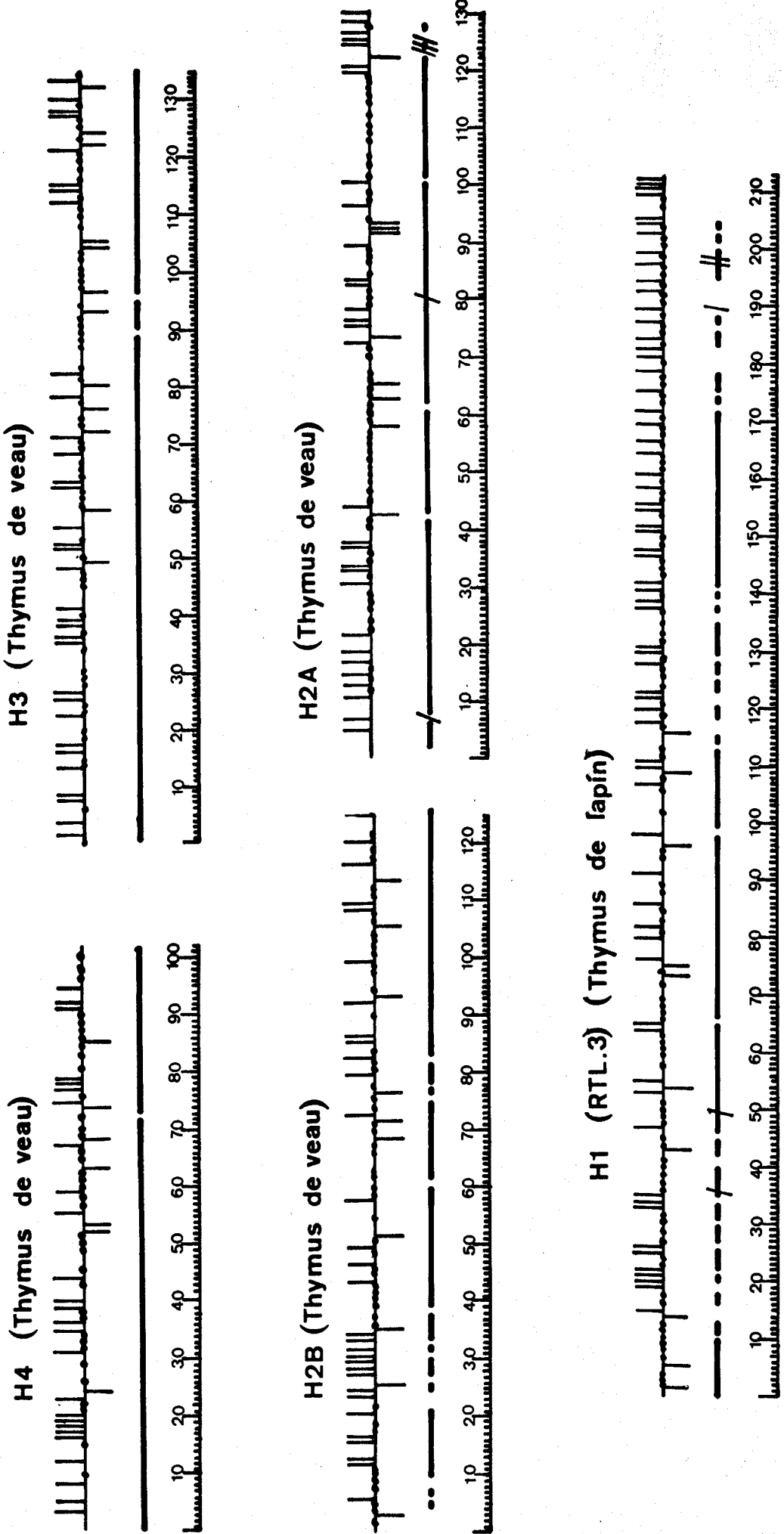


FIGURE 6 - Distribution des résidus acides (▬), basiques (□) et hydrophobes (●). Degré de conservation des séquences au cours de l'évolution (—); comparaison des histones H4 de veau, porc, rat, oursin, pois (143), des histones H3 de veau, poulet, pois, requin, carpe, oursin (143), des histones H2B de veau, truite, embryon d'oursin, drosophile, patelle (40), des histones H2A de veau, rat, truite, oursin (157), des histones H1 de lapin, truite (60).

805  
LILLE

## 2 - 1-2-1 Répartition des résidus

On retrouve généralement une accumulation des résidus basiques dans la moitié N-terminale des histones de la "core particle", tandis que la moitié C-terminale présente un caractère hydrophobe nettement marqué. Une situation inverse prévaut dans l'histone H1.

De cette distribution asymétrique, il se dégage deux conséquences immédiates :

- La région N-terminale, chargée positivement, des histones de la "core particle" serait le siège d'interactions purement électrostatiques avec les groupements phosphate négativement chargés du DNA. Il faut rappeler à ce propos, que c'est au niveau de ces séquences qu'interviennent les modifications post-synthétiques des histones, qui se traduisent par la perte d'une charge positive (acétylation) ou l'apparition d'une charge négative (phosphorylation).

- Les régions hydrophobes des histones seraient impliquées dans les interactions histone-histone.

## 2 - 1-2-2 Définition de domaines variables ou constants

Les travaux de DELANGE sur les histones H3 et H4 de Veau et de Pois ont mis en évidence une remarquable conservation de la structure de ces protéines au cours de l'évolution. Aucune variation de la séquence ne semble être tolérée ; ce qui implique pour ces protéines un rôle fondamental dans la chromatine. Les quelques changements qui ont pu être observés dans les histones H3 et H4 d'autres Eucaryotes supérieurs, sont de nature conservative du type Val Ile, Tyr Phe, Lys Arg. Chez les Eucaryotes inférieurs toutefois, levure ou protistes, les histones H3 et H4 présentent des variations structurales importantes par rapport aux histones d'Eucaryotes supérieurs. Ainsi, l'histone H4 de *Tetrahymena* (protozoaire cilié) possède une séquence N-terminale très différente de celle de l'histone H4 de Veau (49).

Les histones H2A et H2B, quant à elles, présentent des variations structurales importantes qui se traduisent par des changements généralement non conservatifs, des délétions ou des insertions, et affectent des régions bien déterminées de ces molécules. Ces variations interviennent essentiellement dans la région basique N-terminale de ces protéines. Les quelques changements qui ont pu être observés dans les régions hydrophobes sont le plus souvent de nature conservative. Les études structurales comparatives des histones H2A et H2B ont permis de définir différents domaines fonctionnels dans la chaîne peptidique des histones H2A et H2B.

En ce qui concerne l'histone H2A, on peut définir trois domaines (157) :

- Une région N-terminale, du résidu 1 au résidu 20, riche en résidus basiques et variable.
- Une région médiane, du résidu 21 au résidu 118 comportant deux zones hydrophobes nettement définies : 43-71 et 100-118.
- Une région C-terminale, du résidu 119 au résidu C-terminal dans le thymus de Veau, basique et variable.

En ce qui concerne l'histone H2B, on peut définir également trois domaines (143) :

- Une région N-terminale, du résidu 1 au résidu 26, riche en résidus basiques et variable.
- Une région intermédiaire de sept résidus, très basique, possédant dans tous les cas six résidus de lysine ou d'arginine, constante.
- Une région C-terminale de 91 résidus, riche en résidus hydrophobes et généralement constante au cours de l'évolution.

Il semble donc qu'en ce qui concerne les histones H2A et H2B, un certain nombre de séquences N-terminales ait été sélectionné au cours de l'évolution, peut-être pour assurer des processus de régulation spécifique au niveau du DNA.

L'étroite conservation de la région N-terminale des histones H3 et H4 peut paraître surprenante. En effet, la liaison des histones au DNA n'est pas spécifique et n'implique donc pas un tel degré de conservation des structures. SPIKER et ISENBERG (129) ont émis l'hypothèse selon laquelle la région N-terminale de ces histones ne serait pas impliquée dans des interactions histone-DNA mais plutôt dans des interactions beaucoup plus spécifiques et vitales telles que des interactions histone-histone supplémentaires participant à la condensation des nucléosomes ou des interactions histone-protéine non histone.

## 2 - 2 ORGANISATION DES HISTONES DANS LA CHROMATINE

Jusqu'à présent, les données de la cristallographie n'ont pas permis de tirer de conclusions sur l'organisation des histones à l'intérieur du nucléosome. Les éléments d'information dans ce domaine, nous ont été donnés essentiellement par les études de pontage et les études d'interaction entre les différentes histones en solution. Ces deux types d'études concernent deux aspects différents de l'organisation des histones :

- Les études de pontage déterminent une propriété géométrique : elles mesurent la distance entre les deux résidus pontés ; en modifiant la longueur des différents agents de pontage, on peut alors obtenir des renseignements sur les distances relatives des histones.

- Les études d'interaction entre les différentes histones déterminent une propriété thermodynamique : elles définissent les interactions et la force de ces interactions. On peut supposer par exemple que deux histones soient pontées dans le nucléosome sans pour autant interagir l'une avec l'autre. Toutefois, les agents de pontage courts tels la lumière ultra-violette, le tétranitrométhane, les carbodiimides ou le formaldéhyde donnent naissance à des liaisons entre résidus qui avant pontage, devaient vraisemblablement être impliqués dans des interactions thermodynamiquement importantes.

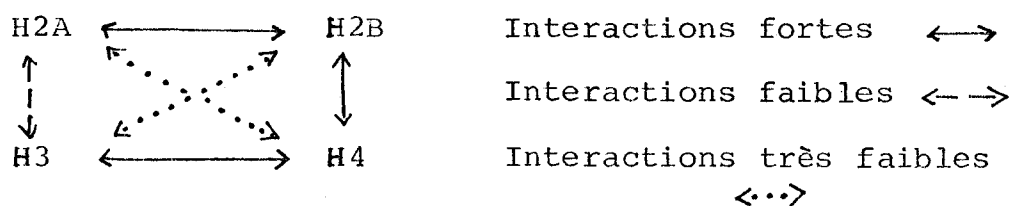


## 2 - 2 ORGANISATION DES HISTONES DANS LA CHROMATINE

### 2 - 2-1 Assemblage des histones

Avant même l'identification du nucléosome, on savait que les histones pouvaient interagir entre elles, en absence de DNA.

Dès 1972, un complexe équimoléculaire formé par les histones H2A et H2B fut identifié (122). Il s'agissait d'un dimère H2A-H2B (65,67). D'autres types de complexes furent ensuite mis en évidence : le complexe H3-H4 sous forme de tétramère (67,113), le complexe H2B-H4 sous forme de dimère (92). D'ANNA et ISENBERG (27) ont résumé les spécificités des interactions entre les différentes histones dans le schéma suivant :



SPERLING et BUSTIN (127) ont fait en 1975, une étude complète du comportement des histones individuelles et des paires d'histones par vitesse et équilibre de sédimentation, par microscopie électronique, ainsi que par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS après pontage des histones par le diméthylsubérimidate. Ces types d'interaction observés *in vitro* se retrouvent dans la chromatine ainsi que l'ont démontré les études de pontage avec les rayons U.V. (84), ou des agents chimiques à molécule courte, le tétranitrométhane (83), les carbodiimides (13) ou le formaldéhyde (61).

L'histone H1, bien que placée à l'extérieur de la "core particle", peut être pontée avec des "core histones" (12,56,111), en particulier avec l'histone H2A (14).

Le fait que les histones H3 et H4 forment un tétramère, que les histones H2A, H2B, H3 et H4 soient présentes en quantité équimoléculaire dans la chromatine, a conduit KORNBERG (66)

à suggérer dès 1974, une organisation des "core histones" en octamère. L'année suivante, THOMAS et KORNBERG (139) ont mis en évidence cet octamère d'histones en pontant la chromatine par le diméthylsubérimidate en milieu NaCl 2M pH 9. WEINTRAUB *et al* (149), la même année, ont retrouvé également une association des quatre histones à force ionique élevée mais ont obtenu après pontage par la formaldéhyde à pH 7, un tétramère hétérotypique H2A-H2B-H3-H4.

Depuis ces premières observations, les études ultérieures ont confirmé l'organisation en octamère des histones dans la "core particle". Cet octamère peut même être isolé et caractérisé en absence de pontage, libre en solution de force ionique élevée (38,114,138). Cette entité moléculaire est cependant labile et facilement endommagée. Concernant l'assemblage des quatre histones, il reste les deux hypothèses :

- la première, proposée par WEINTRAUB *et al* (150), selon laquelle les huit histones s'assembleraient en deux tétramères hétérotypiques

- la seconde, proposée initialement par KORNBERG (66) et généralement acceptée maintenant (38,114,138), selon laquelle les histones H3 et H4 s'assembleraient en un tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> auquel seraient associés deux dimères H2A-H2B.

Quelques observations sont en faveur de la première hypothèse. CAMPBELL et COTTER (17) ont obtenu par diffusion laser sur un mélange des quatre histones, une masse moléculaire de l'ordre de celle du tétramère hétérotypique. CHUNG *et al* (21) ont mis en évidence par sédimentation à basse vitesse, un équilibre entre l'octamère et le tétramère hétérotypique. Un tel modèle est séduisant. Une organisation des histones en deux tétramères hétérotypiques permettrait de rendre compte des demi-nucléosomes observés par OUDET *et al* en microscopie électronique (101). Ce modèle rendrait compte également de la symétrie observée dans le nucléosome par des techniques physiques (43) ou par digestion enzymatique (5,121). L'existence du tétramère hétérotypique H2A-H2B-H3-H4 fait cependant l'objet de nombreuses critiques (38, 138) et bon nombre d'études viennent confirmer l'hypothèse de KORNBERG. De plus récemment, GODFREY *et al*

(50) ont caractérisé l'hexamère  $(H3-H4)_2(H2A-H2B)$  : entité moléculaire intermédiaire entre l'octamère et ses produits de dissociation.

La figure 7 présente l'aspect topologique de l'assemblage des huit histones dans la "core particle", tel qu'il ressort des études de pontage.

La figure 8 présente l'aspect thermodynamique de cet assemblage, tel qu'il ressort des études d'interaction entre les histones.

## 2 - 2-2 Nature des interactions

D'ANNA et ISENBURG (27) ont démontré qu'il existait différents types d'interaction entre les histones. En replaçant deux à deux les histones préalablement dénaturées dans des conditions de force ionique favorisant la formation d'un complexe, ces auteurs ont montré par dichroïsme circulaire que la formation des complexes s'accompagnait d'une augmentation très nette du contenu hélicoïdal. Cette augmentation très nette pour les paires d'histones H2A et H2B, H3 et H4, H2B et H4 n'est pas observée pour les autres combinaisons d'histones.

Des études de reconstitution entre les histones et le DNA ont démontré en outre que l'organisation du DNA en superstructure était en relation avec l'augmentation du taux d'hélicité des histones (151)

Des études de spectroscopie infrarouge (22,87,88) ou raman (96,137) ont permis de conclure que la structure  $\beta$  n'existait pas dans les complexes d'histones ou sur la chromatine elle-même.

EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (38) ont présenté un schéma (figure 7) indiquant la nature des interactions qui maintiennent les huit histones entre elles. Ils étudient par chromatographie de tamisage moléculaire la stabilité de l'octamère en fonction de différents paramètres : la force ionique, la température,

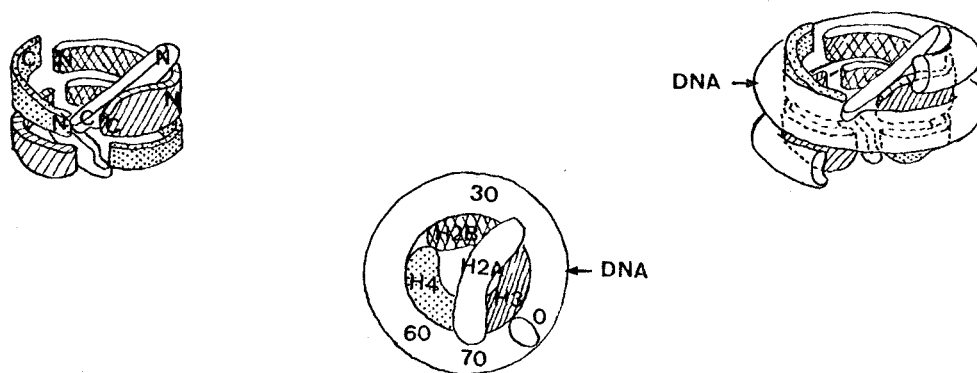


FIGURE 7 - Disposition des histones d'après les résultats obtenus par pontage.

CARTER *et al* (1980) J.Biol.Chem., 295, 748-754.

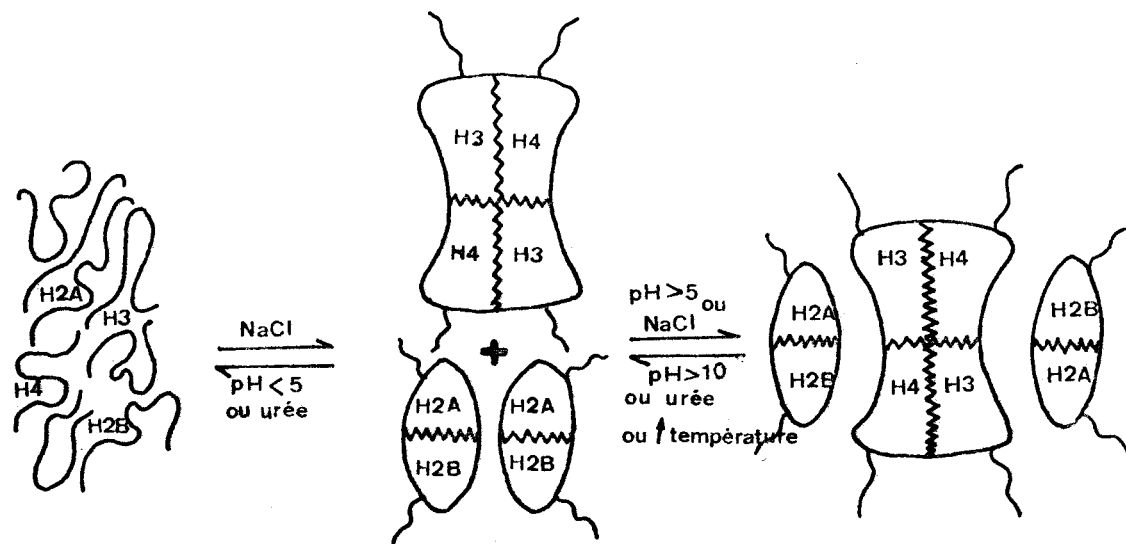


FIGURE 8 - Assemblage des histones en solution et nature des interactions histone-histone.

Forces hydrophobes

liaisons hydrogène

EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (1978) Biochemistry 17, 4955-4964.

la concentration en urée ou en chlorhydrate de guanidine ainsi que le pH. Les résultats obtenus leur permettent de proposer un modèle où l'octamère se trouve maintenu par deux types d'interactions : des interactions fortes d'une part, de nature hydrophobe; stables, maintenant les histones H3 et H4 en tétramère et les histones H2A et H2B en dimères ; des interactions faibles d'autre part, associant en un octamère le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et deux dimères (H2A-H2B). Ces interactions seraient dues à la formation d'un nombre limité de liaisons hydrogène entre des résidus d'histidine et de lysine et/ou entre des résidus d'histidine et de tyrosine. En effet, la dissociation de l'octamère est particulièrement sensible à la température ainsi qu'à de faibles concentrations en agents dénaturants, bien connus pour leur action sur les liaisons hydrogène. De plus, les études en fonction du pH démontrent le rôle joué par les acides aminés histidine (pK = 6,0), tyrosine (pK = 10,1) et lysine (pK = 10,5).

De telles liaisons hydrogène, impliquant un nombre limité d'acides aminés, pourraient être facilement régulées dans la cellule. Leur blocage ou non résulterait en des changements dans la stabilité des nucléosomes, sans affecter les associations en tétramère et en dimère des histones H3 et H4, H2A et H2B. De tels changements dans le nucléosome pourraient alors permettre une accessibilité plus ou moins grande au DNA. Il est intéressant de noter également que si des résidus de lysine sont véritablement impliqués dans le maintien de l'octamère, l'acétylation et la méthylation fourniraient des mécanismes de régulation ponctuels des interactions histone-histone dans le nucléosome.

## 2 - 2-3 Localisation des régions d'interaction

Différentes méthodes permettent de localiser les régions structurées des chaînes polypeptidiques en solution :

- La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est particulièrement adaptée à ce type de recherche . Elle permet en effet d'évaluer la rigidité de la molécule autour de

groupements atomiques déterminés et localisés dans la séquence.

- la prédiction des structures secondaires à partir de la séquence permet également de localiser les régions ayant une forte probabilité d'adopter les conformations en hélices  $\alpha$ , en feuillets plissés- $\beta$  ou en  $\beta$ -turns. Cette méthode repose sur l'attribution à chaque acide aminé d'un paramètre conformationnel. Ce paramètre est calculé d'après la fréquence d'apparition de chaque acide aminé dans les différents types de structure secondaire, sur une trentaine de protéines parfaitement connues par cristallographie (20).

- L'utilisation de fragments peptidiques possédant des caractéristiques structurales précises, permet de limiter les modèles d'interaction et de mettre en évidence les régions indispensables à la formation des complexes.

- Le degré de conservation des séquences indique la position des différents domaines ayant eu des contraintes différentes au cours de l'évolution.

D'autres types de méthodes consistent à travailler directement sur le nucléosome ou la chromatine. L'utilisation d'agents de pontage courts et l'identification d'acides aminés pontés permet de localiser dans la séquence les régions d'interaction. Tout réactif spécifique peut constituer une sonde et permet d'obtenir des renseignements ponctuels sur les régions exposées ou non à la modification chimique. Ces derniers types de méthodes permettent d'étudier les histones dans un environnement plus proche des conditions physiologiques (152).

Les études dans ce domaine ont été très nombreuses. Il en ressort que les quatre histones présentent toutes une région N-terminale plus ou moins étendue, mobile (76,87,88,92), présentant peu de probabilité d'adopter une structure  $\alpha$  ou  $\beta$  stable (41). Cette région n'est pas indispensable à la formation des complexes (11) et du fait de sa basicité serait plutôt impliquée dans des interactions électrostatiques avec le DNA.

Ces interactions électrostatiques s'effectueraient surtout entre des résidus d'arginine et les groupes phosphate du DNA (18, 92). Il faut signaler que cette région N-terminale des histones ne doit pas être la seule région d'interaction avec le DNA puisque des "core particles" peuvent subsister même après élimination de ces régions N-terminales par digestion trypsique (77). Des interactions supplémentaires entre les résidus de tyrosine et les bases du DNA (86) ou des liaisons entre un groupe carboxylique et la guanine (70) pourraient également exister.

Des études de pontage par U.V. puis tétranitrométhane ont permis d'obtenir un trimère H2A-H2B-H4 (84), montrant ainsi qu'il existait sur l'histone H2B, deux sites distincts d'interaction, l'un avec H2A, l'autre avec H4. Le tiers N-terminal de l'histone H2B interagirait avec le DNA, le tiers médian avec H2A, le tiers C-terminal avec H4 (85). La région 37-114 de l'histone H2B (125 résidus) interagirait plus spécifiquement avec l'histone H2A ainsi que l'on montré les études de RMN (87), impliquant dans un pontage un résidu de tyrosine localisé en position 37, 40 ou 42 (31).

La région 31-95 de l'histone H2A (129 résidus) interagirait avec l'histone H2B (87). Un pontage entre la proline 26 de l'histone H2A et une tyrosine de l'histone H2B a été identifié (31). Enfin, l'interaction de l'histone H2A avec l'histone H1, impliquerait la région 58-129 de l'histone H2A et la région 74-106 de l'histone H2B (14).

Les histones H2A et H2B interagiraient avec le tétramère  $(H3-H4)_2$  par des liaisons hydrogène entre des résidus d'histidine et des résidus de lysine ou de tyrosine (38).

En ce qui concerne les histones H3 et H4, des études sur des fragments peptidiques de ces protéines (11), ont montré que les régions 42-120 de l'histone H3 (135 résidus) et 38-102 de l'histone H4 (102 résidus), étaient indispensables à la formation des complexes. L'interaction de ces histones avec les dimères H2A-H2B, implique des résidus d'histidine, de lysine et de tyrosine (38).

## 2 - 3 ROLE DES HISTONES DANS LA CHROMATINE

### 2 - 3-1 Maintien dans la structure

Les histones H3 et H4 jouent un rôle essentiel dans l'organisation de la structure nucléosomale : l'association H3-H4 est suffisante pour conférer au DNA une structure nucléosome-like (64,67,120). Cette structure est maintenue par les interactions des histones entre elles. Celles-ci sont fondamentales car elles semblent avoir été étroitement conservées tout au long de l'évolution. En dépit des quelques variations de séquence, on retrouve en effet les mêmes types d'interaction chez les animaux : veau (27), les végétaux : pois (128), les champignons : une levure (82) et les protistes : *Tetrahymena* (48). L'histone H4 de *Tetrahymena* (Eucaryote inférieur) présente toutefois par rapport aux autres histones H4, quelques variations dans les forces d'interaction (48). Ces variations sont liées sans doute à la séquence particulière de cette histone, différente de celle des autres histones H4 (49).

### 2 - 3-2 Régulation de la fonction structurale

Il semble que la fonction structurale des histones dans la chromatine soit modulée par différents facteurs qui peuvent être :

- des modifications post-synthétiques,
- des interactions avec des NHP,
- l'apparition de variants.

#### 2 - 3-2-1 Modifications post-synthétiques

Au niveau des régions d'interaction histones-DNA, on observe plusieurs types de modifications post-synthétiques telles que l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation ou l'ADP-ribosylation. Ces modifications sont le plus souvent en corrélation avec des modifications de structure ou de fonction de la chromatine.



Ainsi, de nombreux arguments indiquent que l'acétylation des histones est en corrélation avec les régions actives du génome (4). Les sites d'acétylation sont les groupements  $\epsilon\text{-NH}_2$  des résidus de lysine, en position 5, 8, 12 et 16 pour l'histone H4, 9, 14, 18 et 23 pour l'histone H3, 8, 35, 39 et 47 pour l'histone H2B et en position 5 pour l'histone H2A (4, 34).

La phosphorylation intervient au niveau de la fonction hydroxyle des résidus de sérine et de thréonine. Cette modification affecte principalement les histones H1 et H2B. La phosphorylation des différents types d'histones pourrait être en relation avec différents niveaux d'organisation de la chromatine. Ainsi, au cours de l'interphase, on met en évidence une H1 phosphorylée, appelée H1<sub>In</sub>. Cette phosphorylation serait en relation avec des modifications de l'organisation de la chromatine au niveau moléculaire. De même, au cours de la mitose, on observe une H1 phosphorylée, appelée H1<sub>Mi</sub>. Cette phosphorylation, ainsi que celle se produisant sur l'histone H3, serait en relation avec la condensation des chromosomes. La phosphorylation de l'histone H2A serait en relation avec la formation d'un niveau intermédiaire de structure de la chromatine : la condensation en hétérochromatine.

La méthylation est un phénomène plus limité que les autres modifications post-synthétiques. Elle concerne surtout les histones riches en arginine H3 et H4, qui sont méthylées au niveau de résidus de lysine en position 9 et 27 (histone H3) et en position 20 (histone H4) (46). La méthylation apparaît être un phénomène irréversible (136). Elle se produirait après la formation des nucléosomes. Son rôle reste cependant inconnu.

Un autre type de modification post-synthétique des histones est l'ADP-ribosylation (57) : l'ADP-ribosylation est une modification des résidus arginine, lysine, acide glutamique ou phosphosérine, par des chaînes de poly(ADP-ribose). Cette modification affecte principalement les histones H1 et H2B. Les histones H2A, H3 et H4 sont modifiées à un moindre degré. Rien n'est encore connu sur les conséquences physico-chimiques ou physiologiques de cette modification dans la chromatine.

## 2 - 3-2-2 Interaction avec des NHP

Alors que les interactions des histones entre elles ont fait l'objet de nombreuses études et sont maintenant assez bien définies, les interactions des histones avec d'autres protéines de la chromatine ont été, jusqu'à présent, peu étudiées.

La première interaction histone-non histone qui ait été mise en évidence est une interaction d'un type particulier, qui met en jeu une liaison covalente isopeptidique entre le groupe carboxyle terminal de l'ubiquitine et le groupe  $\epsilon$ -aminé du résidu de lysine 119 de l'histone H2A (59). Cette interaction aboutit à la formation de la protéine A-24 qui est un constituant des nucléosomes (51). La présence de cette protéine dans les nucléosomes semble être en rapport avec la diminution de l'activité génétique. Environ 10 p.100 des histones H2A de thymus de Veau sont ainsi modifiées (15).

Un autre exemple d'interaction histone-protéine non histone fait intervenir une protéine acide appelée facteur de LASKEY qui se lie aux histones et aurait un rôle catalytique dans le processus d'assemblage des histones avec le DNA, lors de la formation des nucléosomes (72).

Des interactions entre l'histone H1 et des protéines HMG-1 et HMG-2 ont également été identifiées (123,159). Leur signification biologique n'est pas encore connue.

## 2 - 3-2-3 Apparition de variants d'histones

On définit comme variants, des histones appartenant à la même classe dans une espèce donnée et qui présentent des différences dans leur structure primaire (60). On peut se demander quelle est la signification biologique de l'apparition de ces variants.

Durant l'embryogénèse par exemple, on peut observer l'arrêt de la synthèse d'une histone donnée et le déclenchement de la synthèse d'une nouvelle histone de la même classe (91).

Durant la spermatogénèse, la synthèse des histones peut être bloquée : c'est ainsi que chez les Téléostéens, les histones sont remplacées par les protamines. Chez les Echinodermes, les histones subsistent, mais sont généralement différentes des histones somatiques (36,132,133). Chez les Mammifères, de nouvelles histones, H1 et H2B, apparaissent durant la spermatogénèse.

Selon NEWROCK (91) et WEINTRAUB (147), l'apparition de variants d'histones, serait en relation avec le remaniement de la chromatine qui se produit lors du développement de nouveaux types cellulaires.

L'extension N-terminale des histones H2B et H1 dans le sperme d'Oursin, pourrait être un processus d'empaquetage du DNA, durant la suppression temporaire de l'activité transcriptionnelle (143). Cette région contient en effet, une structure pentapeptidique répétitive du type Pro-Arg-Lys-Gly-Ser qui du fait de sa basicité et du site potentiel de phosphorylation sur la sérine, pourrait être le centre d'une association réversible avec le DNA.

Il semble donc qu'il faille réviser le jugement antérieur qui avait défini les histones de la "core particle" comme étant des protéines très conservées. Elles apparaissent maintenant comme des protéines dont les structures peuvent varier, soit par des modifications post-synthétiques, soit par des interactions avec les NHP, soit par des divergences au cours de l'évolution ou à l'intérieur d'une classe particulière d'histones, par la présence de variants ayant des structures primaires particulières. Ces variations pourraient induire des états fonctionnels différents dans la chromatine.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

## CHAPITRE 1

PREPARATION DES HISTONES ET DES COMPLEXES D'HISTONES  
CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES HISTONES H2A ET H2B DE SEICHE

Nous avons effectué la préparation d'histones provenant de deux espèces animales différentes, appartenant à deux branches bien distinctes de l'arbre phylogénétique : le Veau (mammifère) et la Seiche, *Sepia officinalis* (Céphalopode). La méthodologie utilisée pour l'isolement des histones de testicule de Seiche est calquée sur les méthodes de préparation des histones de thymus de Veau.

Nous nous sommes particulièrement attachée à l'étude des histones H2A et H2B de Seiche, qui ont été caractérisées par électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide, par analyse en acides aminés et par l'étude de leur séquence. La détermination de la structure primaire des histones de Seiche est effectuée au sein de l'équipe du Dr Pierre SAUTIERE. Elle s'inscrit dans le cadre d'un programme d'étude des modifications de la structure primaire des histones en fonction de l'évolution des espèces.

Nous décrivons également dans ce chapitre la préparation des complexes H2A-H2B et  $(H3-H4)_2$ . La préparation de l'octamère d'histones est également décrite et discutée.

Nous n'avons fait figurer dans ce chapitre que les grands principes des méthodes de préparation des histones et de leurs complexes. Une description détaillée de ces méthodes est présentée dans l'appendice technique qui figure à la fin de cet ouvrage.

## 1 - 1 PREPARATION DES HISTONES

### 1 - 1-1 Préparation de la chromatine

Dans les tissus comme le thymus de Veau ou le testicule de Seiche, le cytoplasme représente une fraction peu importante dans la cellule et il est possible de préparer la chromatine sans isoler au préalable les noyaux.

### 1 - 1-2 Extraction sélective des fractions d'histones

Nous avons adopté la technique décrite par JOHNS en 1967 (62). L'extrait GuCl-éthanol correspondant à la fraction F2a de JOHNS est traité par l'acétone suivant un protocole mis au point dans notre laboratoire par M.COUPPEZ (23). Ce protocole permet d'obtenir directement l'histone H4 pure (fraction F2a1). Le tableau III résume les différentes voies d'extraction des fractions d'histones.

### 1 - 1-3 Isolement des histones de Veau

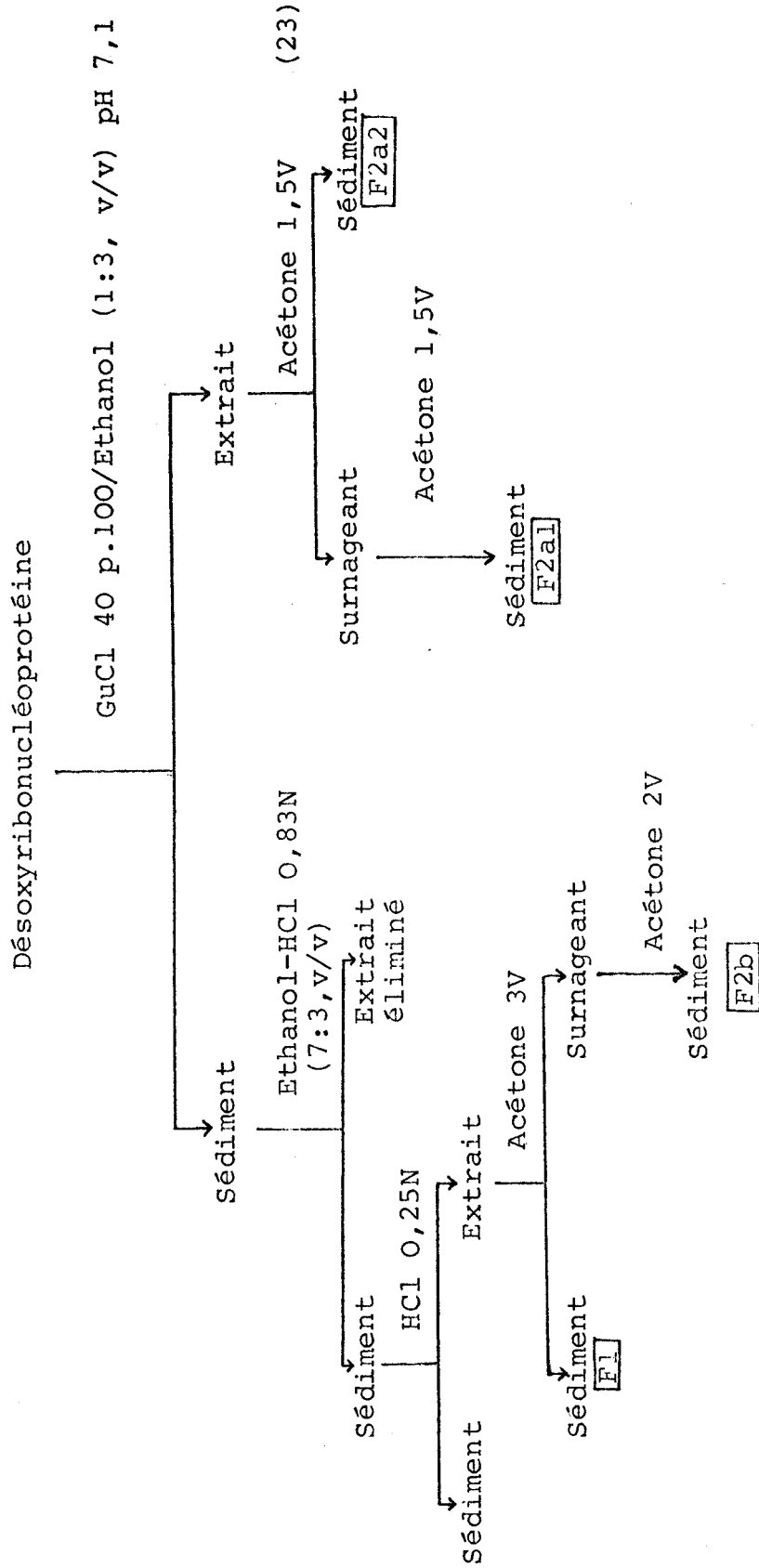
A l'exception de la fraction F2a1 dont l'unique constituant est l'histone H4, les autres fractions obtenues doivent subir une ou plusieurs étapes de purification car elles correspondent à des mélanges plus ou moins hétérogènes d'histones parfois associées à des protéines non histones. Ainsi, les histones H2A et H3 sont isolées pures à partir de la fraction F2a2 et l'histone H2B est isolée pure à partir de la fraction F2b.

#### 1 - 1-3-1 Isolement des histones H2A et H3

La fraction F2a2 contient les histones H2A et H3 dans des proportions variables suivant les préparations. Elle contient en outre, un peu d'histone H4 et quelques NHP. Une précipitation différentielle à l'acétone a été effectuée dans un premier

TABEAU III

Procédé d'extraction sélective des histones d'après la méthode de JOHNS (1967) (62)





temps , afin d'obtenir des fractions fortement enrichies en chacune de ces histones.

Les étapes des précipitations différentielles à l'acétone sont résumées dans le tableau IV.

- L'histone H3 obtenue dans le sédiment 1 est séparée de la faible quantité d'histone H2A résiduelle, par passage sur colonne de Biogel P 10 en milieu HCl  $10^{-2}M$ .
- L'histone H2A obtenue dans le sédiment 3 est contaminée par des NHP. Elle est purifiée par passage sur colonne de Biorex 70. La colonne est éluée par un gradient linéaire de GuCl de 7,5 à 12,5 p.100 en tampon phosphate de sodium 0,1M pH 6,8.

#### 1 - 1-3-2 Isolement de l'histone H2B

La fraction F2b est très hétérogène. Elle contient principalement l'histone H2B et une quantité plus ou moins importante de l'histone H2A. Elle renferme en outre un peu d'histone H3, ainsi que quelques NHP. Par passage sur colonne de Biorex 70, il est possible d'obtenir l'histone H2B, ainsi que le dimère H2A-H2B (122). La colonne est éluée par un gradient linéaire de GuCl de 7 p.100 à 11 p.100 en tampon phosphate de sodium 0,1M pH 6,8. L'histone H2B est débarrassée des NHP résiduelles par passage sur colonne de Biogel P 10 en milieu HCl  $10^{-2}M$ .

#### 1 - 1-4 Isolement des histones de Seiche

Les histones H2A et H2B de testicule de Seiche ont été purifiées respectivement à partir des fractions F2a2 et F2b.

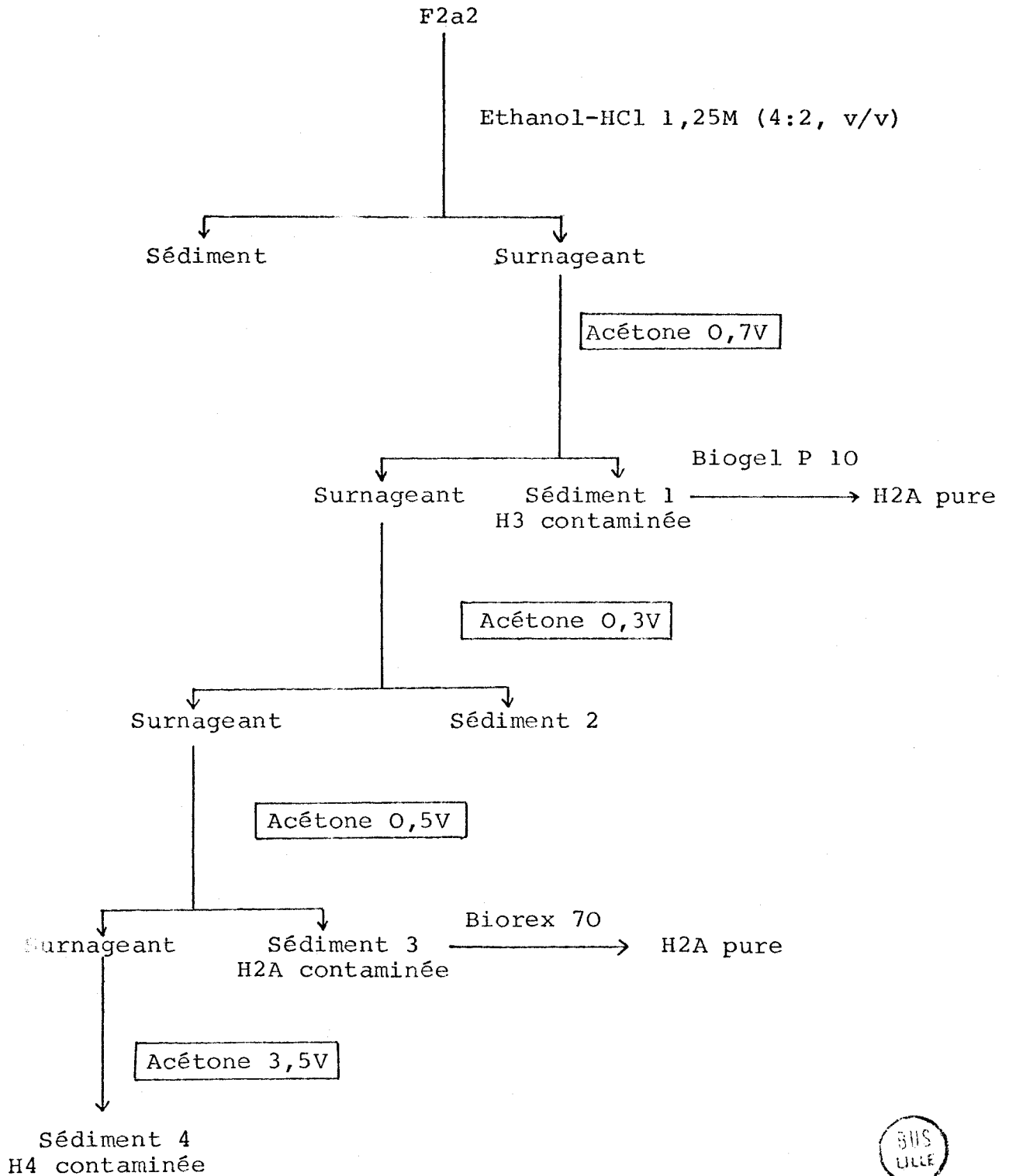
##### 1 - 1-4-1 Isolement de l'histone H2A

La fraction F2a2 isolée de la chromatine de testicule de Seiche contient les histones H2A et H4. Elle est en outre légèrement contaminée par l'histone H3. Par simple passage sur colonne de Biogel P 10, équilibrée et éluée par HCl  $10^{-2}M$ , il est possible d'obtenir l'histone H2A pure.



TABLEAU IV

PREPARATION DES HISTONES H2A ET H3 DE THYMUS DE VEAU A PARTIR DE LA FRACTION F2a2 (23)



### 1 - 1-4-2 Isolement de l'histone H2B

La fraction F2b isolée de la chromatine de testicule de Seiche contient les histones H2B et H3 ainsi que quelques NHP. L'obtention de l'histone H2B pure nécessite deux chromatographies successives, la première sur colonne de Biogel P 10 en milieu HCl  $10^{-2}$ M afin d'éliminer les NHP, la seconde sur colonne de Sephadex G-100 en milieu acétate de sodium 50 mM afin de séparer les histones H2B et H3.

### 1 - 1-5 Contrôle de pureté

L'application d'un protocole comportant des procédés sélectifs d'extraction et de précipitation ainsi que des méthodes de purification par chromatographie de filtration sur gel et/ou d'échanges d'ions, nous a permis d'obtenir les histones H2A, H2B, H3 et H4 de thymus de Veau et les histones H2A et H2B de testicule de Seiche.

La pureté de nos préparations a été contrôlée par analyse électrophorétique à pH 2,7 en milieu urée 2,5M (Figure 9) et à pH 3,2 en milieu urée 6,25M (Figure 10) (103).



1 2 3 4 5 1 6 7 8

**FIGURE 9** - Electrophorèse des histones de thymus de Veau (V) et de testicule de Seiche (S) en gel de polyacrylamide à pH 2,7 en milieu urée 2,5M (103).

- 1 : Histones totales (V)
- 2 : H2A (V)
- 3 : H2B (V)
- 4 : H3 (V)
- 5 : H4 (V)
- 6 : Histones totales (S)
- 7 : H2A (S)
- 8 : H2B (S)

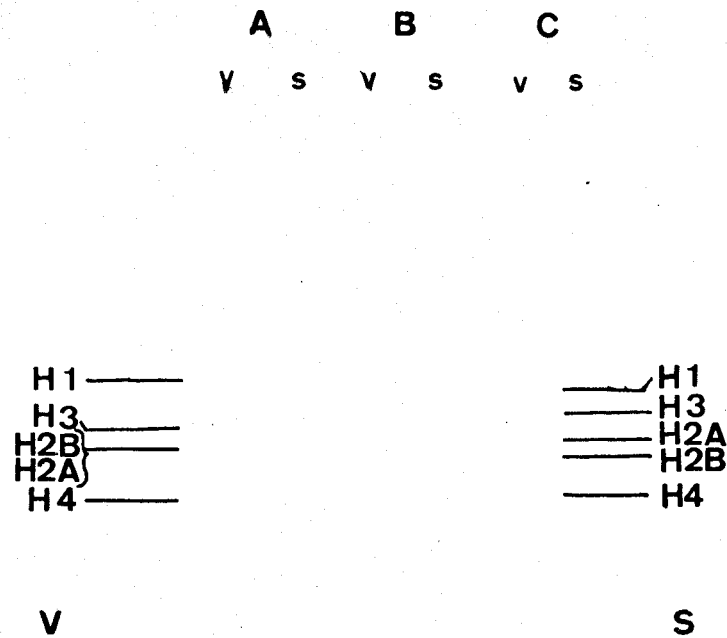


FIGURE 10 - Electrophorèse des histones de thymus de Veau (v) et de testicule de Seiche (s) en gel de polyacrylamide à pH 3,2 en milieu urée 6,25M (103).

A : Histones totales

B : Histones H2A

C : Histones H2B

## 1 - 2 CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES HISTONES H2A ET H2B DE SEICHE

### 1 - 2-1 Caractérisation

Les histones H2A et H2B isolées de testicule de Seiche ont été caractérisées par leur comportement électrophorétique, leur composition en acides aminés. Ces caractéristiques sont comparées à celles de leurs homologues isolées du thymus de Veau.

#### 1 - 2-1-1 Comportement électrophorétique

Le comportement électrophorétique est un critère simple pour la caractérisation des histones. Dans le système de PANYIM et CHALKLEY (103) (décrit dans l'appendice technique), les histones sont séparées suivant leur taille moléculaire et leur charge électrique.

Les histones H2A et H2B de thymus de Veau sont bien séparées à pH 2,7 en milieu urée 2,5M (Figure 9). Par contre, ce système ne permet pas de séparer les histones H2A et H2B de testicule de Seiche. Pour séparer ces deux protéines, l'électrophorèse doit être conduite à pH 3,2 en milieu urée 6,25M. Dans ce système, les histones H2A et H2B de Veau ne sont pas séparées (Figure 10).

Ces différences de comportement électrophorétique entre les histones de Seiche et leurs homologues de Veau traduisent des différences structurales plus ou moins importantes que seule l'étude de la séquence en acides aminés de ces protéines est en mesure de déterminer.

### 1 - 2-1-2 Composition en acides aminés

Les compositions en acides aminés des histones H2A et H2B de testicule de Seiche sont présentées dans le tableau V. Les résultats sont exprimés en nombre de résidus par molécule d'histone et ont été obtenus à partir de plusieurs analyses effectuées sur des hydrolysats de 24 et 72 heures. Dans le même tableau figurent, à titre de comparaison, les compositions en acides aminés des histones H2A et H2B de thymus de Veau.

L'histone H2A de testicule de Seiche présente des différences marquées par rapport à son homologue du thymus de Veau. La molécule est plus petite (124 résidus au lieu de 129). Elle possède un résidu de méthionine. Les histones H2A en général n'en renferment pas. Il faut signaler également la perte de deux résidus histidine ainsi qu'une variation du nombre des résidus sérine et thréonine. Ceci est observé fréquemment dans les histones H2A isolées de poisson et d'invertébré marin. Enfin, l'histone H2A de Seiche, contrairement à l'histone H2A des Echinodermes (oursin, étoile de mer...), ne contient qu'un résidu de phénylalanine au lieu de deux.

L'histone H2B de testicule de Seiche présente une composition en acides aminés proche de celle de l'histone H2B de thymus de Veau. Une seule différence significative peut être notée au niveau des résidus de proline : l'histone H2B de Seiche n'en contient que 4 au lieu de 6 chez son homologue de Veau.

### 1 - 2-2 Etude structurale

Les études de séquence sont effectuées au laboratoire par D.WOUTERS et A.MARTIN qui nous ont aimablement communiqué leurs résultats avant publication. Nous les en remercions vivement.

TABLEAU V

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B DE VEAU  
ET DE SEICHE

Acides aminés	HISTONE H2A		HISTONE H2B	
	Veau	Seiche	Veau	Seiche
Asp	8	8	6	6
Thr	5	3	8	8
Ser	4	6	14	16
Glu	12	11	10	9
Pro	5	5	6	4
Gly	14	14	7	6
Ala	17	16	13	12
Val	8	9	9	8
Met	0	1	2	2
Ile	6	6	6	5 ou 6
Leu	16	15	6	7
Tyr	3	3	5	5
Phe	1	1	2	2
Lys	14	13	20	19
His	4	2	3	3
Arg	12	11	8	8 ou 9
Nombre de résidus	129	124	125	120-122
Rapport Lys/Arg	1,16	1,18	2,5	2,37

\* Valeurs exprimées en nombre de résidus par mole de protéine



### 1 - 2-2-1 Séquence en acides aminés de l'histone H2A

La séquence en acides aminés de l'histone H2A de testicule de Seiche présente 14 changements et 5 délétions par rapport à celle de l'histone H2A de thymus de Veau (Figure 11).

Rappelons que les études structurales menées sur des histones H2A isolées de différentes espèces ont permis de définir trois domaines le long de la chaîne polypeptidique (157): le premier, du résidu 1 à 20 : basique et variable, le second, du résidu 21 à 118 : hydrophobe et conservé au cours de l'évolution, le troisième, du résidu 119 au résidu C-terminal : basique et variable.

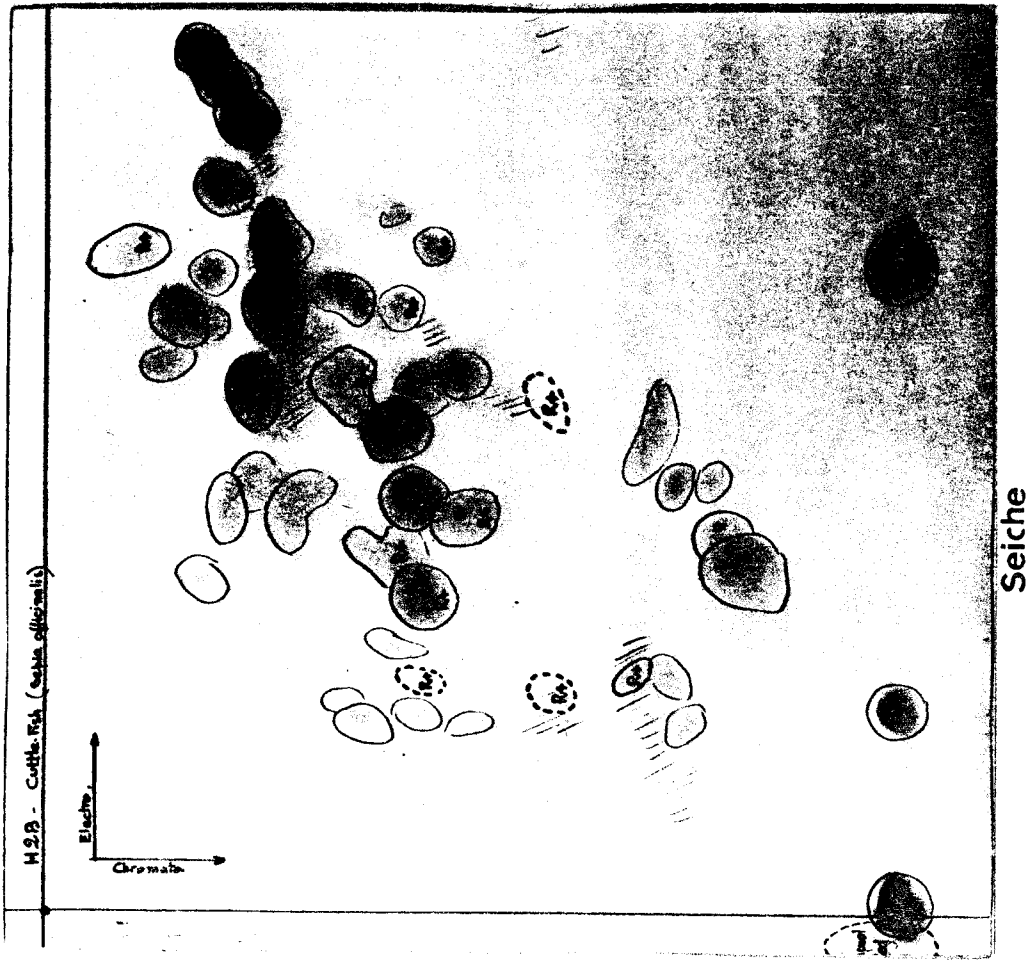
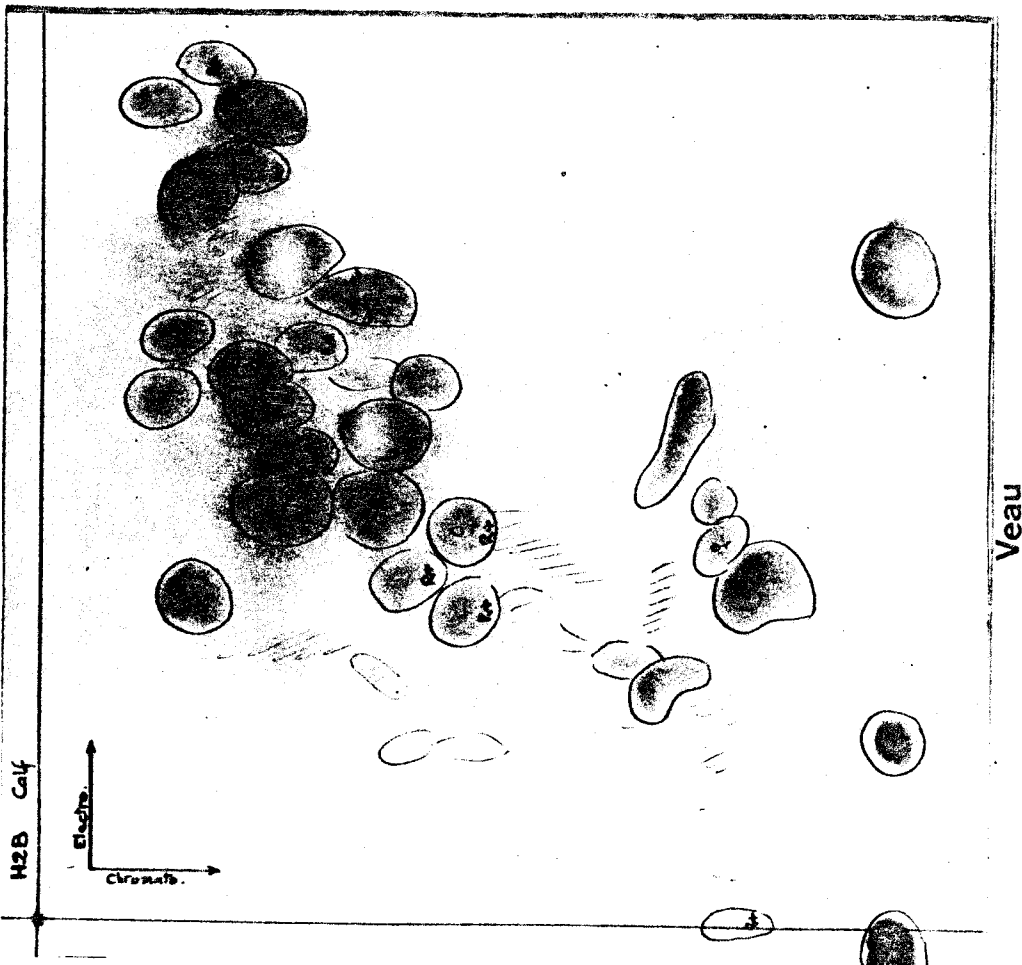
Les 5 délétions et 6 changements sont observés dans les domaines N- et C-terminaux. Dans le domaine central impliqué dans les interactions avec l'histone H2B, les 8 changements relevés sont pour la plupart conservatifs. Il faut toutefois accorder une attention particulière aux changements acide glutamique → glutamine en position 41 (perte d'une charge négative), thréonine → alanine en position 59 (formation d'un  $\beta$ -turn supplémentaire) et lysine → glycine en position 99 (perte d'une charge positive).

### 1 - 2-2-2 Éléments de structure primaire de l'histone H2B

Les études structurales sur l'histone H2B ont débuté trop récemment pour que l'on puisse disposer d'informations substantielles sur la séquence de cette protéine. On sait que les histones H2B de Veau et de Seiche présentent une structure différente d'après leur comportement électrophorétique (voir figure 10 ,C page 47). Ces différences n'apparaissent que discrètement dans la composition en acides aminés; elles sont mieux soulignées quand on compare les cartes peptidiques des hydrolysats tryptiques des deux protéines (Figure 12).







BUS  
LILLE

FIGURE 12 - Cartes peptidiques des hydrolysats tryptiques des histones H2B de Seiche et de Veau

### 1 - 3 PREPARATION DES COMPLEXES D'HISTONES

Les complexes d'histones ont été isolés ou préparés sur colonne pour les études de spectroscopie U.V. différentielle.

#### 1 - 3-1 Préparation du dimère H2A-H2B

Le dimère H2A-H2B a été obtenu sur colonne de Biorex 70 éluée par un gradient linéaire de GuCl de 7 p.100 à 11 p.100 dans le tampon phosphate 0,1M, pH 6,8. L'histone H2B pure est également recueillie à l'issue de cette chromatographie (Figure 13). A partir de 500 mg de la fraction F2b, il a été possible d'obtenir, outre 90 mg d'histone H2B pure (Figure 5, fraction 5), 40 mg de complexe H2A-H2B pur (Figure 5, fraction 8). Après dialyse contre l'eau, les solutions ont été lyophilisées et conservées à -20°C.

#### 1 - 3-2 Préparation du tétramère (H3-H4)<sub>2</sub>

Le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> a été préparé également sur colonne de Biorex 70, dans un gradient linéaire de GuCl de 8 p.100 à 13 p.100 selon la technique décrite par M.COUPPEZ (23). 500 mg d'un mélange équimoléculaire des histones H3 et H4 pures ont été déposés sur la colonne. Des complexes (H3-H4)<sub>2</sub> différant par leur degré d'acétylation ont pu être ainsi séparés le long du gradient (Figure 14). A 4°C, il est possible d'augmenter le rendement de préparation de ces complexes en minimisant le phénomène d'agrégation. La quantité d'histones se décrochant de la colonne pour une concentration en GuCl de 40 p.100 (Figure 14, fraction 9) est en effet bien moindre à 4°C qu'à température ambiante.

Nous avons pour notre part travaillé sur les fractions majeures obtenues par cette technique et constituées de complexes (H3-H4)<sub>2</sub> ne présentant aucun degré d'acétylation. Les autres fractions préparées en grande quantité font l'objet d'études réalisées par M.COUPPEZ.

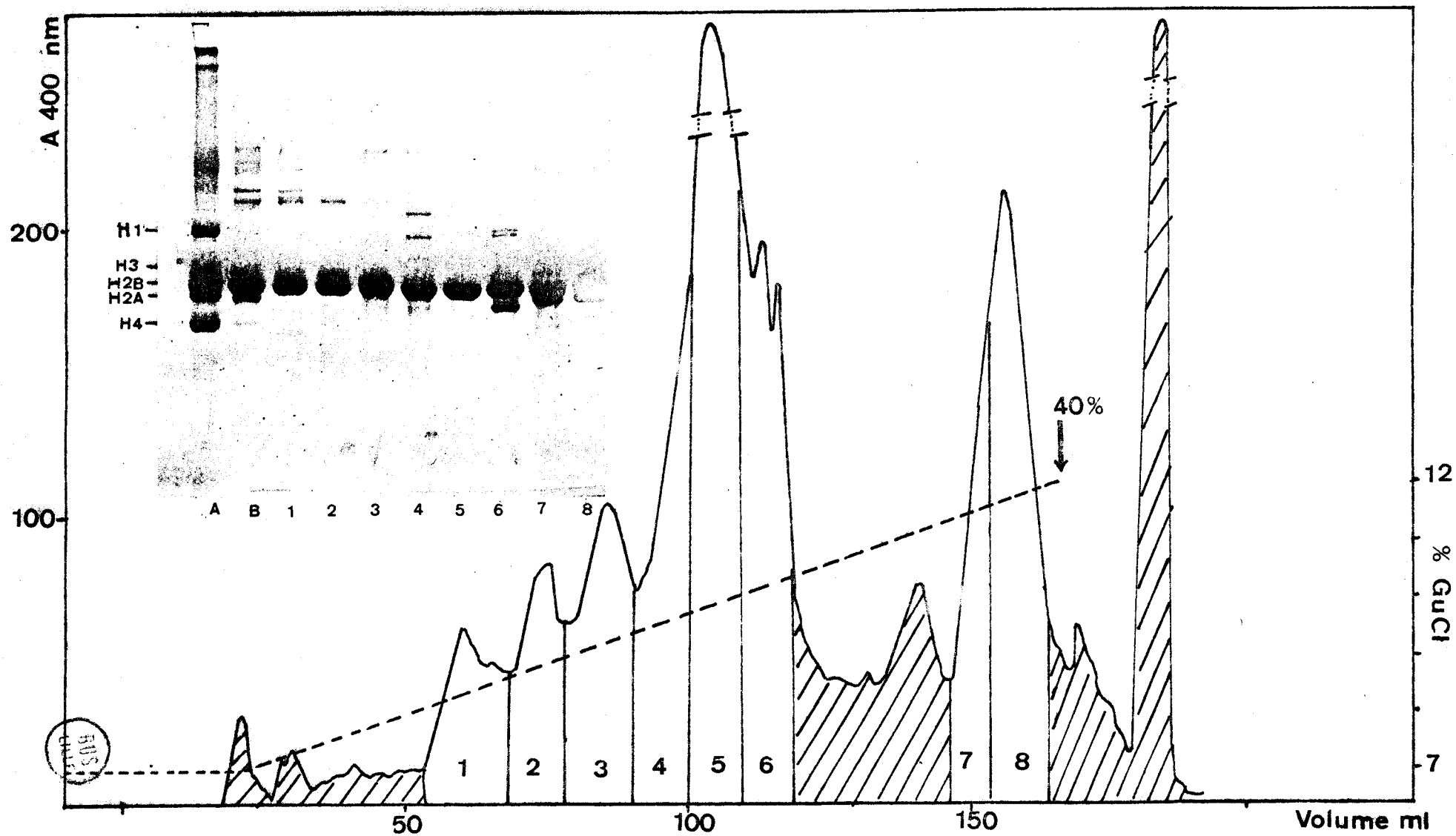


FIGURE 13 - Chromatographie sur colonne de Biorex 70 de la fraction F2b. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à pH 2,7 en milieu urée 2,5M (103). A : histones totales de thymus de Veau, B : fraction F2b.

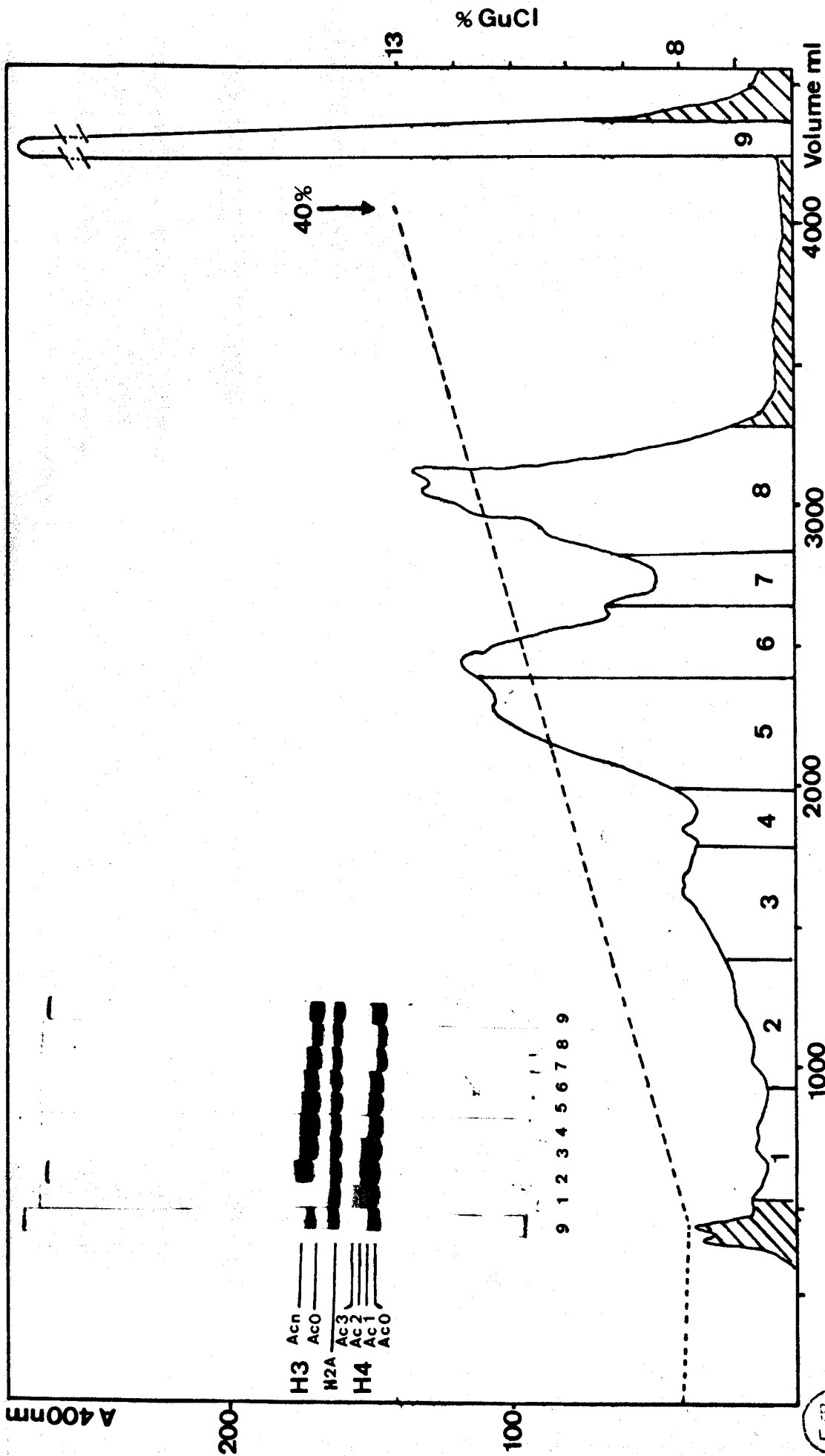


FIGURE 14 - Chromatographie sur colonne de Biorex 70 d'un mélange équimoléculaire des histones H3 et H4 pures. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à pH 2,7 en milieu urée 2,5M (103) L'histone H2A a été ajoutée à chaque fraction comme témoin de migration.

### 1 - 3-3 Préparation de l'octamère

Lors des études de spectroscopie U.V. différentielle, nous avons été amenée à préparer libre en solution, sans pontage, l'octamère des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4.

Les histones totales extraites de la chromatine en milieu HCl 0,25M ont été traitées par l'acide perchlorique à 5 p.100 (63) afin de séparer l'histone H1 des histones H2A, H2B, H3 et H4.

EICKBUSH et MOUDRIANAKIS ayant déjà réalisé ce type de préparation, nous avons ensuite suivi leur méthodologie (38). Les histones provenant de la préparation d'histones totales d'où H1 a été éliminée par traitement à l'acide perchlorique ont été déposées sur colonne de Sephadex G-100 en milieu NaCl 2M, pH 7,5.

Nous obtenons (Figure 15):

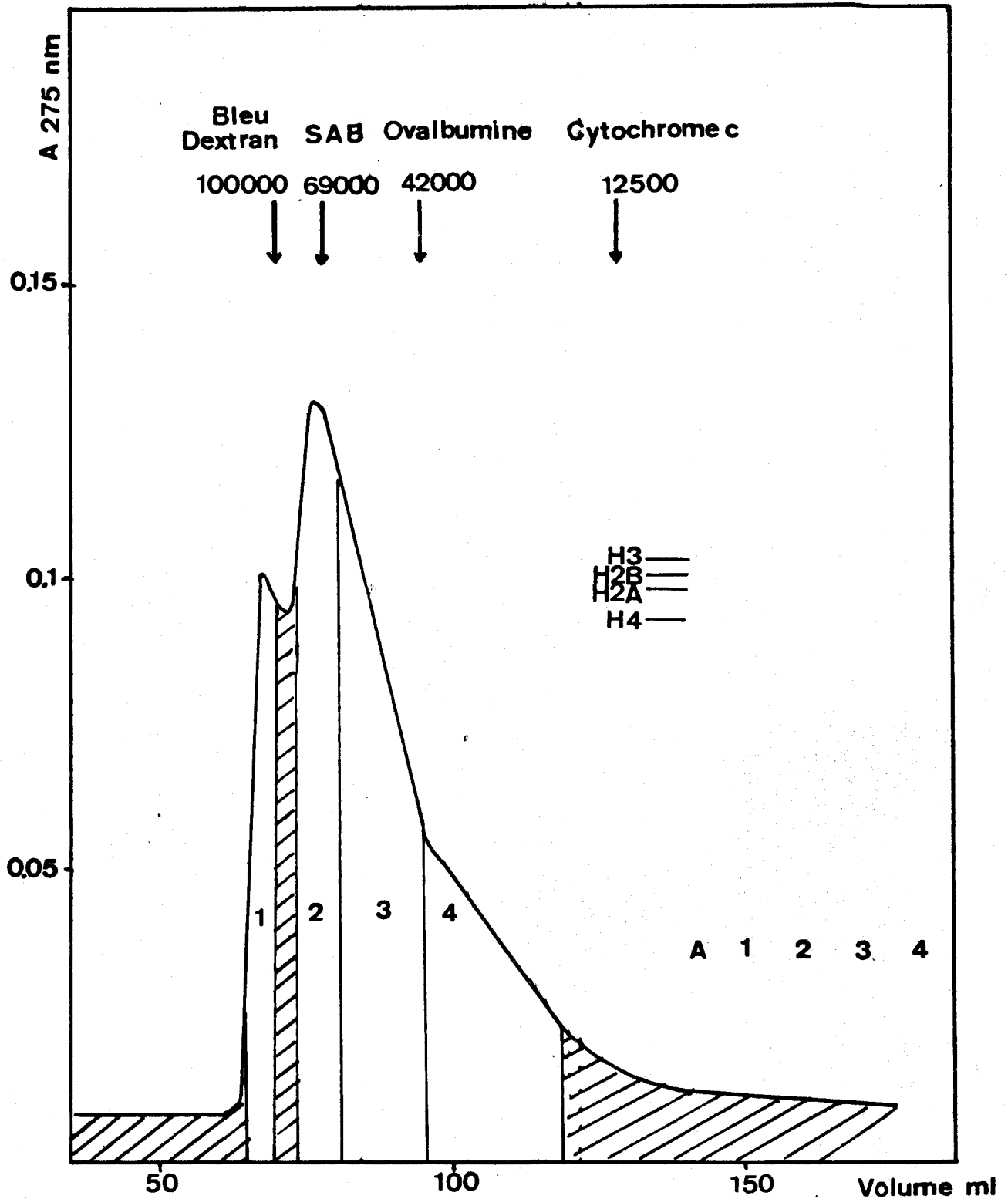
- correspondant au volume d'exclusion (fraction 1), un matériel vraisemblablement très agrégé, difficile à resolubiliser après dialyse et lyophilisation. Ce matériel n'apparaît pas par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, même après la dénaturation classique qui précède ce type d'analyse. Ce matériel exclu est constitué selon nous d'agrégats correspondant aux histones en excès qui n'ont pas participé à la formation de l'octamère. La présence d'histones excédant les proportions moléculaires, n'apparaît pas surprenante ; certaines histones ayant pu être perdues lors des différentes étapes d'extraction.

- un second pic (fraction 2) élué pour une masse moléculaire apparente de 86.000. Il est constitué des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4.

- une dernière fraction (fraction 4), constituée des histones H2A et H2B, éluée pour une masse moléculaire apparente correspondant à celle du dimère H2A-H2B (24.700).

- une fraction intermédiaire (fraction 3), constituée des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4.

Différentes études ont montré que l'octamère libre en solution, en absence de pontage était une entité moléculaire en équilibre avec ses produits de dissociation. Selon les auteurs,



**FIGURE 15** - Chromatographie sur colonne de Sephadex G-100 en milieu NaCl 2M, pH 7,5, d'histones totales dont H1 a été éliminée par précipitation à l'acide perchlorique. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à pH 2,7 en milieu urée 2,5M (103). A: fraction déposée

rappelons que ces produits de dissociation peuvent être le tétramère  $(H3-H4)_2$  et le dimère H2A-H2B (38,50,66,138) ou le tétramère hétérotypique H2A-H2B-H3-H4 (21,150). La première proposition est généralement admise maintenant. Quel que soit le type d'association des quatre histones dans l'octamère, celui-ci constitue un édifice moléculaire particulièrement fragile et il est nécessaire de se placer dans certaines conditions (38, 50) pour favoriser la formation de cet octamère par rapport à ses produits de dissociation. On utilise généralement :

- un milieu NaCl 2M
- un pH compris entre 7 et 9,5
- une température inférieure à 24°C
- une concentration en protéines supérieure à 1 mg/ml.

GODFREY *et al* (50) ont démontré en effet par équilibre de sédimentation que l'octamère était l'espèce prédominante pour une concentration totale en protéines supérieure à 1 mg/ml. Une entité moléculaire intermédiaire : l'hexamère constitué du tétramère  $(H3-H4)_2$  et d'un seul dimère H2A-H2B (Masse moléculaire = 81.000) existerait et ne serait favorisée que pour une concentration en protéines inférieure à 0,1 mg/ml. A 4°C, cependant, l'octamère resterait l'entité moléculaire prédominante, même pour les faibles concentrations en protéines.

Bien qu'ayant réuni toutes les conditions précédemment décrites, en absence de toute caractérisation du mélange si ce n'est le profil chromatographique et l'analyse électrophorétique, il nous est impossible de définir le type d'association des quatre histones entre elles ; en particulier, nous ne pouvons pas distinguer si la fraction 2 correspond à l'octamère ou à l'hexamère décrit par l'équipe de MOUDRIANAKIS.

Afin de séparer plus efficacement les agrégats, l'octamère (108.000), l'éventuel hexamère (81.000), le tétramère  $(H3-H4)_2$  (54.000) et du dimère H2A-H2B (27.700), nous avons effectué la chromatographie sur colonne de Sephadex G-200. Les résultats obtenus ont été décevants. En effet, sur Sephadex G-200,



tout se passe comme si le pouvoir de résolution de la colonne, en séparant plus efficacement les différents "complexes", déplaçait l'équilibre vers les formes de dissociation  $(H3-H4)_2$  et  $H2A-H2B$ . De ce fait, le peu d'"octamère" obtenu était contaminé par un pic majeur voisin d' $(H3-H4)_2$ .

Si le profil chromatographique que nous avons obtenu sur Sephadex G-100 peut être amélioré, nous pensons toutefois qu'une certaine quantité d'octamère a pu néanmoins être préparée dans les conditions utilisées :

- Nous obtenons un pic majeur contenant les quatre histones éluées pour une masse moléculaire apparente de 86.000 supérieure à celle du tétramère hétérotypique (54.400).
- Dans les conditions utilisées (force ionique, pH, température, concentration), c'est l'octamère qui doit être favorisé sur l'hexamère.
- Enfin, si l'hexamère était présent en quantité importante, nous aurions dû observer comme EICKBUSH et MOUDRIANAKIS un pic significatif de dimère  $H2A-H2B$ , ce qui n'est pas le cas.
- Nous pensons en outre que la fraction 1 élue à l'exclusion contient les agrégats des histones en excès n'ayant pas participé à la formation de l'octamère. La présence de tels agrégats a pu être observée sans ambiguïté sur colonne de Sephadex G-200.

Pour ces différentes raisons, nous avons effectué les études de spectroscopie U.V. différentielle sur la fraction 2 correspondant à un octamère, qu'il nous resterait certes à caractériser de façon plus précise.

La caractérisation sur colonne pourrait être notamment améliorée par la nature du dépôt. Il est évident que l'aptitude des histones à se réassocier en octamère est particulièrement dépendante du traitement subi lors des étapes d'extraction de ces histones de la chromatine. Ainsi, les auteurs ayant parfaitement caractérisé l'octamère libre en solution (21,38,114,138), ont tous extrait cet octamère par les solutions salines. Nous avons quant à nous travaillé sur des histones extraites par les acides (HCl 0,25N) puis traitées par l'acide perchlorique et

peut être irréversiblement endommagées dans leur aptitude à retrouver leur conformation native. La reconstitution de l'octamère à partir d'un mélange équimoléculaire des quatre histones individuelles est quant à elle presque impossible. Un tel protocole aboutit à la formation d'un peu d'octamère, de beaucoup d'agrégats.

Nous pourrions donc améliorer la technique de préparation de l'octamère en travaillant sur des histones directement extraites de la chromatine par des traitements évitant de dénaturer la conformation native de l'octamère.

## CHAPITRE 2

## ETUDE DES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE PAR DICHROÏSME CIRCULAIRE

Depuis quelques années, les études structurales réalisées sur les histones H2A et H2B d'espèces différentes ont mis l'accent sur un certain nombre de variations de séquence, observées tout le long de la chaîne polypeptidique. Ces variations pourraient aboutir à des changements dans les forces d'interaction nécessaires au maintien de l'édifice nucléosomal dans les différentes espèces considérées. Au cas où de tels changements existent, les acides aminés substitués pourraient alors jouer le rôle de sondes dans l'étude des régions impliquées dans les interactions histone-histone.

Ces changements peuvent être étudiés par dichroïsme circulaire en appliquant la méthode des variations continues.

Nous avons considéré dans notre cas particulier les interactions des histones H2A et H2B isolées de thymus de Veau et de testicule de Seiche, ces deux derniers types d'histones faisant parallèlement l'objet d'études structurales dans le laboratoire du Dr Pierre SAUTIERE. La méthode des variations continues a été appliquée afin de démontrer dans un premier temps l'existence ou non d'interaction entre les différentes histones H2A et H2B. Elle a été appliquée ensuite à la mesure de la constante d'association  $K$  des complexes homologues (formés d'histones provenant de la même espèce) et hétérologues (formés d'histones provenant d'espèces différentes). Comme nous le verrons plus loin, la constante d'association  $K$  d'un système, en mesurant l'équilibre entre un complexe et ses produits de dissociation, permet d'estimer l'intensité des forces d'interaction nécessaires au maintien de ce complexe.

## 2 - 1 METHODE DES VARIATIONS CONTINUES : RAPPELS THEORIQUES

La méthode des variations continues (117,145) a été décrite dans le cas particulier des histones par D'ANNA et ISENBERG (26).

### 2 - 1-1 Principe

On mélange deux substances A et B, de même concentration molaire en proportions variables et on mesure une propriété particulière intensive des solutions résultantes.

Dans le cas des histones, cette propriété peut être le signal dichroïque à 220 nm. En effet, l'interaction entre deux histones s'accompagne d'une modification de leur structure secondaire que l'on caractérise à 220 nm par l'augmentation très nette du contenu hélicoïdal des molécules. Cette caractéristique des complexes d'histones est donc utilisée pour les études en variations continues.

La différence entre chacune des valeurs observées et la valeur correspondante d'un mélange où il n'y aurait aucune interaction :  $\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_N$ , est reportée en fonction de la fraction molaire d'un des composés du mélange.

La fraction molaire  $X_B$  du composé B pour laquelle  $\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_N$  est maximum est reliée à la stoechiométrie  $n$  par la relation suivante :

$$n = \frac{1 - X_B}{X_B}$$

Pour  $X_B = 0,5$ , le complexe est équimoléculaire et il est possible de calculer la constante d'association  $K$ .

## 2 - 1-2 Calcul de la constante d'association pour un mélange équimoléculaire

Soient deux substances A et B, de même concentration molaire  $M_0$ , mélangées en proportions variables : X ml de B sont ajoutés à (1-X)ml de A de sorte que la somme des concentrations est toujours égale à  $M_0$ . A et B réagissent selon l'équation :



La constante d'association K est donnée par l'équation 1

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

On définit au temps  $t_0$  :

$$\begin{aligned} [A_0] &= (1-X) M_0 \\ [B_0] &= X M_0 \end{aligned}$$

Pour une réaction équimoléculaire ( $X = 0,5$ ) on définit :

- au temps  $t_0$   $[A_0] = [B_0] = \frac{M_0}{2}$
- à l'équilibre  $[A] = [B] = \frac{M_0}{2} - [AB]$
- si la réaction était totale  $[AB]_T = \frac{M_0}{2}$

### 2 - 1-2-1 Variation de la concentration en complexe AB formé en fonction de la fraction molaire

. Si la réaction était totale,

- Quand A est en excès par rapport à B :

$$[AB] = [B_0] = X M_0 \quad ; \quad \text{équation d'une droite de pente } +M_0$$

- Quand B est en excès par rapport à A :

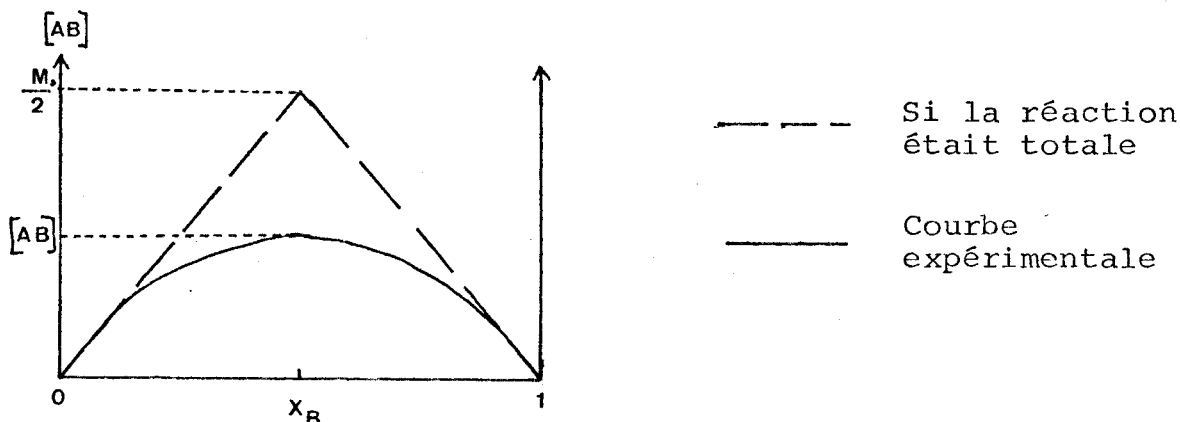
$$[AB] = [A_0] = (1-X)M_0 ; \text{ equation d'une droite de pente } -M_0$$

- A l'équimolarité :

$$[AB] = \frac{M_0}{2}$$

. La réaction n'étant pas totale,

On obtient la courbe expérimentale présentée ci-dessous :



La concentration en complexe AB formé à l'équilibre nous est inconnue mais peut être reliée pour  $X_B = 0,5$  à une grandeur observable qui lui est fonction.

## 2 - 1-2-2 Relation entre concentration en complexe formé et grandeur observable

Dans le cas des histones, la grandeur observable est le signal dichroïque à 220 nm. On peut montrer que la concentration en complexe AB formé à l'équilibre est directement proportionnelle à la valeur  $\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_N$ . Ceci n'est vrai qu'au maximum de l'interaction : pour  $X_B = 0,5$ .

Soient  $\Delta\varepsilon$ , la valeur expérimentale observée et  $\Delta\varepsilon_{AB}$ ,  $\Delta\varepsilon_A$ ,  $\Delta\varepsilon_B$ , les propriétés intensives de chacune des substances AB, A et B, on peut écrire :

$$\begin{aligned} \Delta\varepsilon \cdot M_o &= \Delta\varepsilon_{AB} [AB] + \Delta\varepsilon_A [A] + \Delta\varepsilon_B [B] \\ \Delta\varepsilon \cdot M_o &= \Delta\varepsilon_{AB} [AB] + \Delta\varepsilon_A \left( \frac{M_o}{2} - [AB] \right) + \Delta\varepsilon_B \left( \frac{M_o}{2} - [AB] \right) \\ M_o \left( \Delta\varepsilon - \frac{\Delta\varepsilon_A + \Delta\varepsilon_B}{2} \right) &= [AB] (\Delta\varepsilon_{AB} - \Delta\varepsilon_A - \Delta\varepsilon_B) \\ \Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_N &= \frac{\Delta\varepsilon_{AB} - \Delta\varepsilon_A - \Delta\varepsilon_B}{M_o} [AB] \end{aligned} \quad (26)$$

Par l'intermédiaire des courbes obtenues en variations continues, il est possible de connaître pour  $X_B = 0,5$  la valeur théorique  $\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_N$  correspondant à une concentration connue en complexe. En effet, en extrapolant des tangentes aux fractions molaires 0 et 1 (7,11), on obtient pour  $X_B = 0,5$ , la valeur extrapolée  $\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_N$  d'une réaction qui serait totale, correspondant à la concentration connue en complexe AB que l'on aurait dans ce cas,  $\frac{M_o}{2}$ .

A partir des valeurs de  $\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_N$  expérimentales et extrapolées, et à partir de la concentration  $\frac{M_o}{2}$  en complexe AB si la réaction avait été totale, on peut calculer la concentration en complexe AB à l'équilibre puis déduire ensuite la constante d'association K.

## 2 - 2 PARTIE EXPERIMENTALE

### 2 - 2-1 Préparation des solutions

1 à 2 mg d'histone sont dissous dans 1 ml d'une solution urée 7M, HCl  $10^{-2}$ M pendant une nuit à 4°C. La solution est ensuite dialysée contre HCl  $10^{-2}$ M afin d'éliminer toute trace d'urée.

La concentration de l'histone est déterminée par spectroscopie U.V. à 274,5 nm (voir appendice technique). Les solutions sont ajustées à une concentration en protéines de  $0,5 \times 10^{-5}M$  et constituent les solutions stocks.

Neuf solutions contenant les histones H2A et H2B en proportions variables ont été utilisées pour l'étude en variations continues. La somme des concentrations dans chacune des solutions est constante :

Solution	1	2	3	4	5	6	7	8	9
H2A	2ml	1,75	1,50	1,25	1	0,75	0,50	0,25	0
H2B	0	0,25	0,50	0,75	1	1,25	1,50	1,75	2ml

- Chaque solution est ajustée à pH 7 avec quelques  $\mu l$  d'une solution de soude 2M.

- 40  $\mu l$  d'une solution de phosphate de sodium 0,5M, pH 7,0 (60 p.100  $Na_2HPO_4$ , 40 p.100  $NaH_2PO_4$ ) sont ensuite ajoutés à chaque solution de protéine afin d'obtenir une concentration finale en phosphate de 10 mM.

## 2 - 2-2 Etudes de dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire exprimés par  $\{\theta\}$  en  $degré.cm^2$  par dmole de résidu ont été calculés selon la relation 1. Pour les études en variations continues, les spectres dichroïques ont été exprimés par  $\Delta\epsilon$  en  $cm^{-1}$  par mole d'histone et calculés selon la relation 2. Ces relations figurent dans l'appendice technique.

Pour chaque fraction molaire de la substance B,  $X_B$ , on reporte  $\Delta\epsilon$  expérimental. La concentration est exprimée en moles d'histones (et non en moles de complexes) en prenant  $M = M_0 = 0,5 \times 10^{-5}M$  (cellules de 0,2 cm, sensibilité de  $2 \times 10^{-6}$ ). A partir des substances pures (aux fractions molaires 0 et 1), on peut



déduire  $\Delta\varepsilon_N$  pour un mélange qui n'interagit pas. La différence  $\Delta\varepsilon - \Delta\varepsilon_N$  est utilisée pour le calcul de K.

### 2 - 2-3 Extrapolation des pentes initiales

Pour éviter tout caractère arbitraire au tracé des tangentes aux points  $X = 0$  et  $X = 1$ , nous avons calculé celles-ci à partir de la dérivée du polynôme d'interpolation de NEWTON  $P(X)$ . Ce polynôme de NEWTON est l'expression mathématique de la courbe que nous ne connaissons qu'empiriquement par le seul tableau des valeurs  $b_0, b_1, b_2 \dots b_n$  qu'elle prend pour les valeurs  $a_0, a_1, a_2 \dots a_n$  de la variable X.

On dresse le tableau des valeurs définissant la courbe de la façon suivante :

X	b	$\Delta b$	$\Delta^2 b$	$\Delta^3 b$
a	$b_0$			
a+h	$b_1$	$\Delta b_0$		
a+2h	$b_2$	$\Delta b_1$	$\Delta^2 b_0$	
a+3h	$b_3$	$\Delta b_2$	$\Delta^2 b_1$	$\Delta^3 b_0$

Chaque terme est égal à la différence entre le terme inférieur le plus voisin de la colonne de gauche et le terme supérieur le plus voisin de cette même colonne.

Le polynôme  $P(X)$  s'exprime alors de la façon suivante :

$$P(X) = b_0 + u\Delta b_0 + \frac{1}{2} u(u-1) \Delta^2 b_0 + \dots + \frac{1}{n!} u(u-(n-1)) \Delta^n b_0$$

$$\text{avec } u = \frac{X - a}{h}$$

a = valeur initiale  
X = fraction molaire  
h = pas

La dérivée au point initial est donnée par  $P'(X)$  :

$$P'(X) = \frac{1}{h} \left( \Delta b_0 - \frac{1}{2} \Delta^2 b_0 + \frac{1}{3} \Delta^3 b_0 - \frac{1}{4} \Delta^4 b_0 + \dots + \frac{1}{n} \Delta^n b_0 \right)$$

## 2 - 3 RESULTATS ET DISCUSSION

### 2 - 3-1 Mise en évidence des interactions

On peut mettre en évidence l'interaction entre deux histones en comparant le spectre expérimental du mélange équimoléculaire avec le spectre théorique d'un mélange dans lequel les deux histones n'interagiraient pas.

Les courbes de variations continues permettent de démontrer plus clairement et sans ambiguïté l'existence ou non de telles interactions.

#### 2 - 3-1-1 Complexes homologues et hétérologues

Les résultats obtenus montrent que si les histones H2A et H2B de thymus de Veau interagissent l'une avec l'autre, il n'en est pas de même pour les histones H2A et H2B isolées de testicule de Seiche lorsqu'elles sont placées dans les mêmes conditions (Figure 16). Les mêmes études réalisées sur les complexes hétérologues H2A-H2B Seiche/Veau et Veau/Seiche (Figure 17) indiquent que c'est l'histone H2B de Seiche qui est responsable de la non formation du complexe.

Pour retrouver une interaction entre l'histone H2B de Seiche et une histone H2A, il est nécessaire de réduire préalablement l'histone H2B (Figure 18).

Les courbes obtenues en variations continues sont présentées figure 19. Elles démontrent sans ambiguïté que lorsque l'histone H2B de Seiche n'est pas réduite, aucune interaction n'a jamais lieu avec l'histone H2A : ni à l'équimolarité ( $X_{H2B} = 0,5$ ), ni pour toute autre valeur  $X_{H2B}$  du mélange.

Lorsque cette histone H2B de Seiche est réduite, on obtient pour les complexes homologues et hétérologues une représentation comparable des courbes de variations continues, indiquant dans tous les cas que les interactions sont maximales à l'équimolarité.

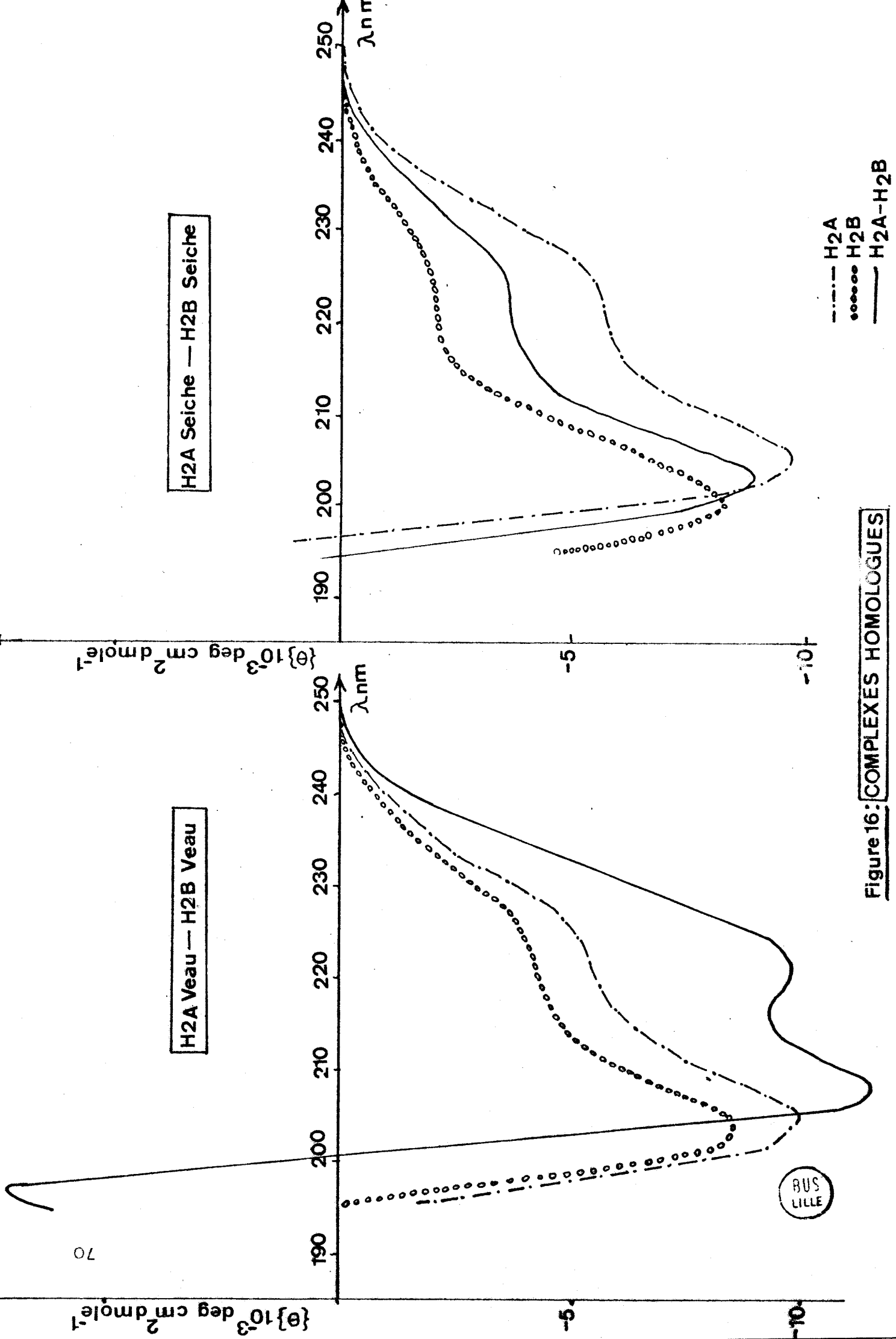


Figure 16: COMPLEXES HOMOLOGUES

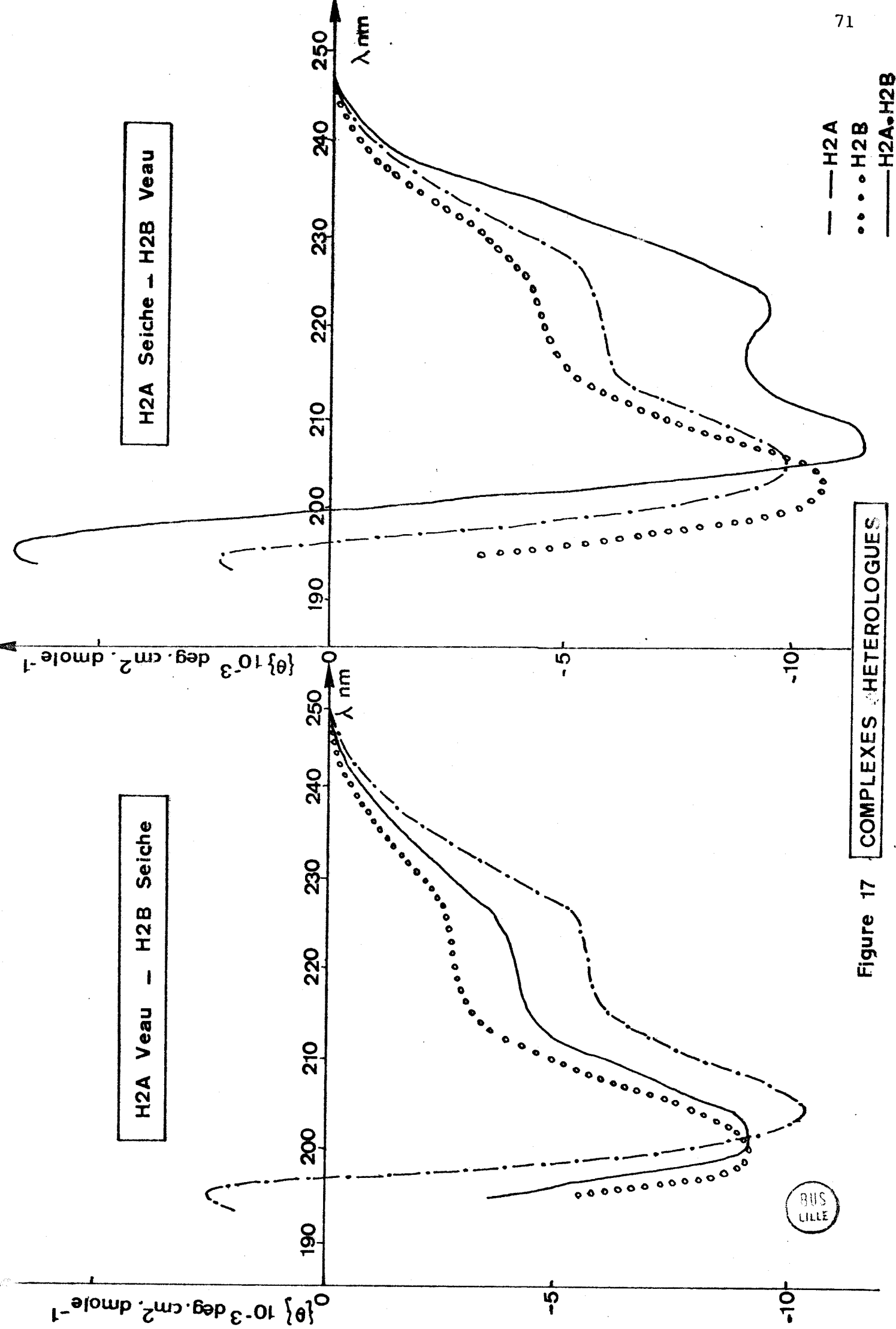
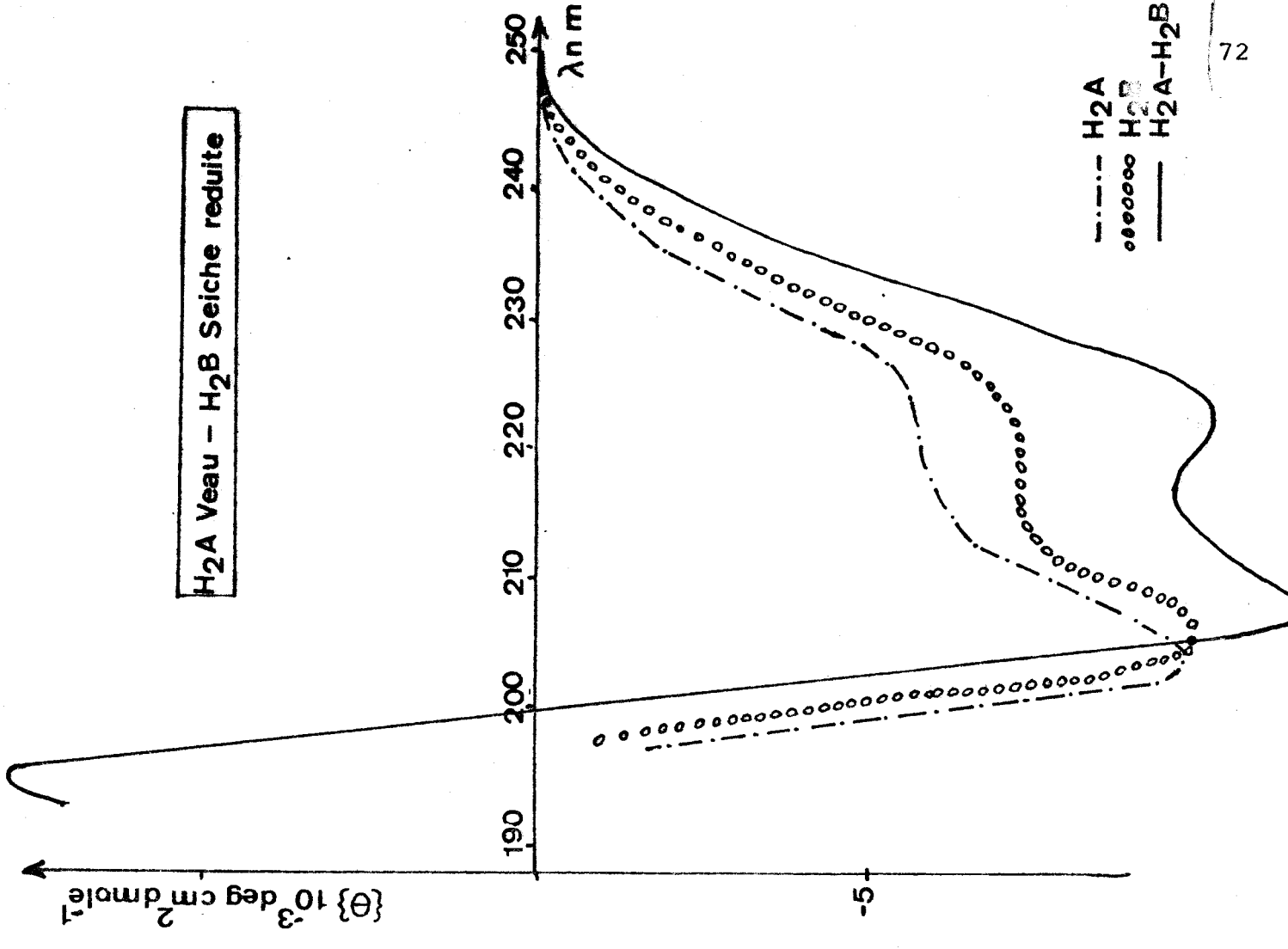
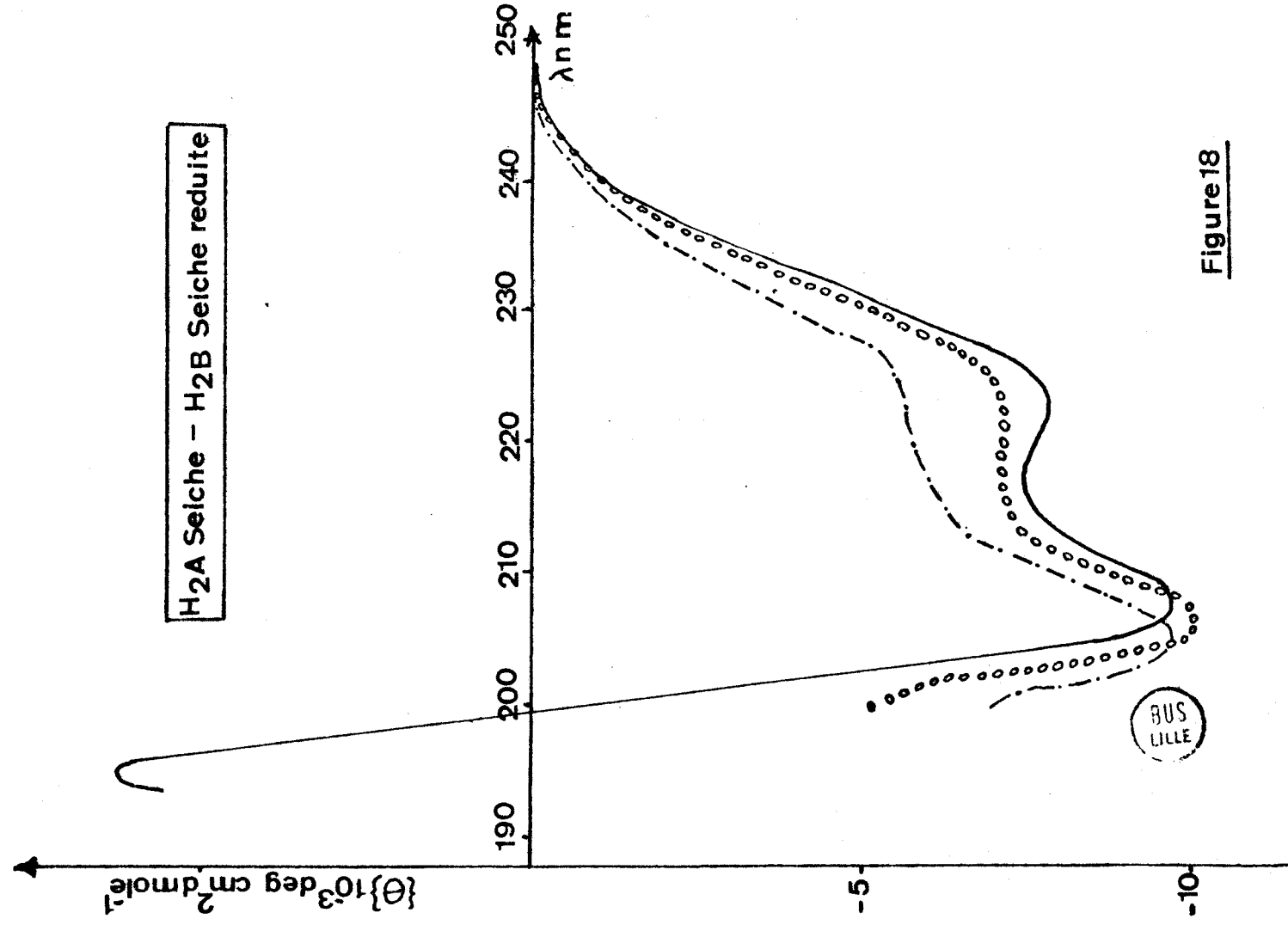


Figure 17 COMPLEXES HETEROLOGUES



BUS LILLE

Figure 18

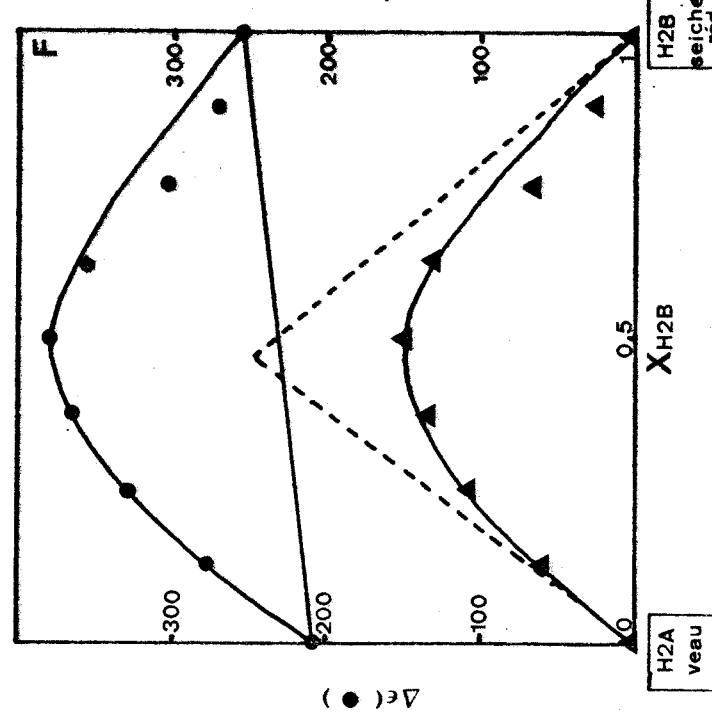
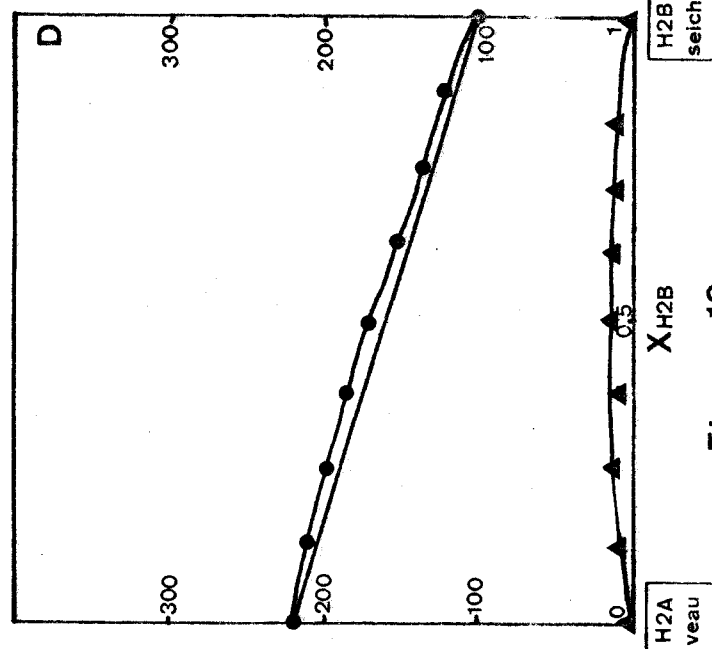
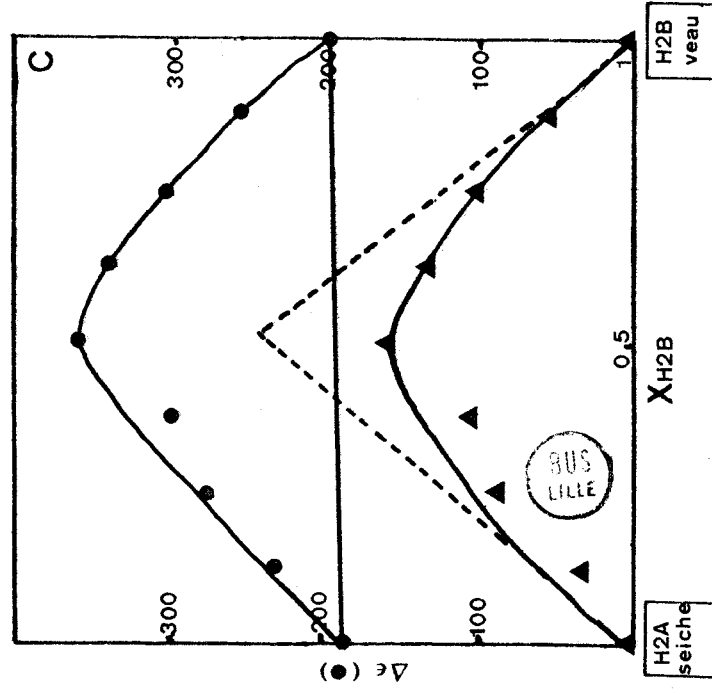
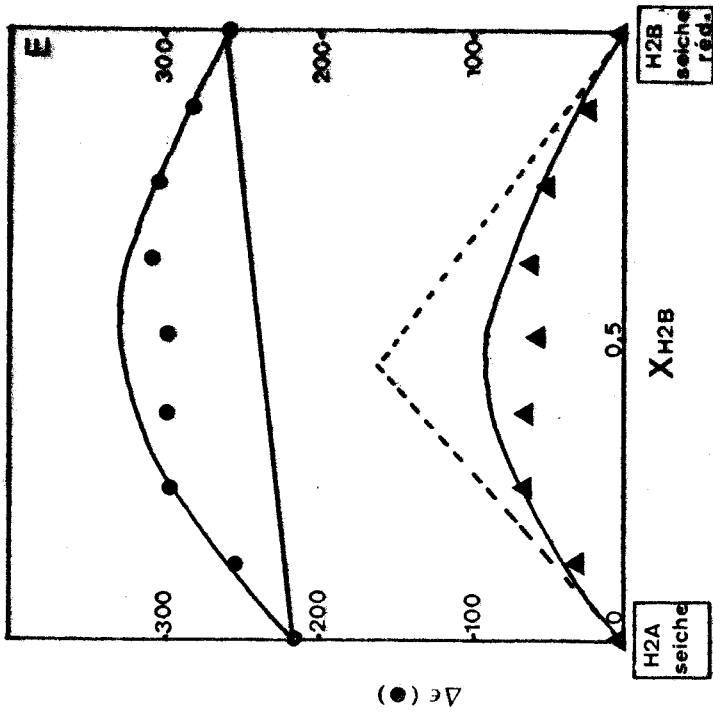
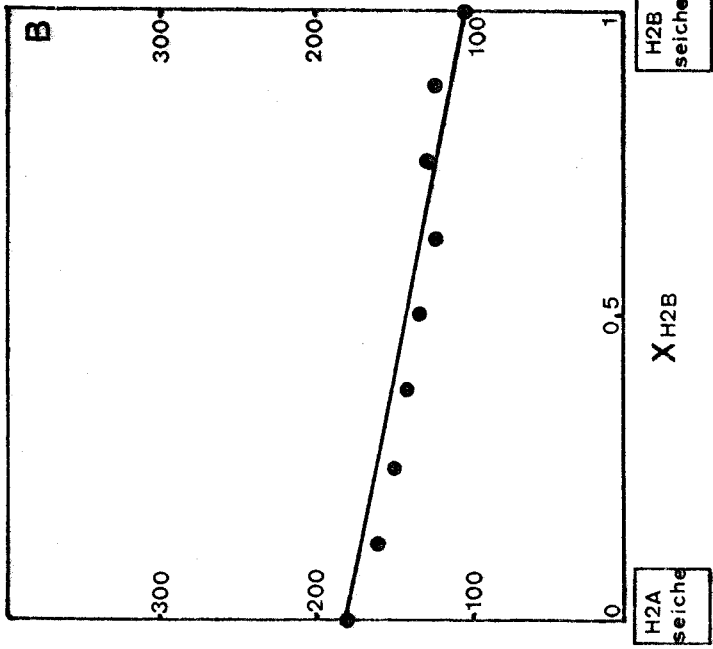
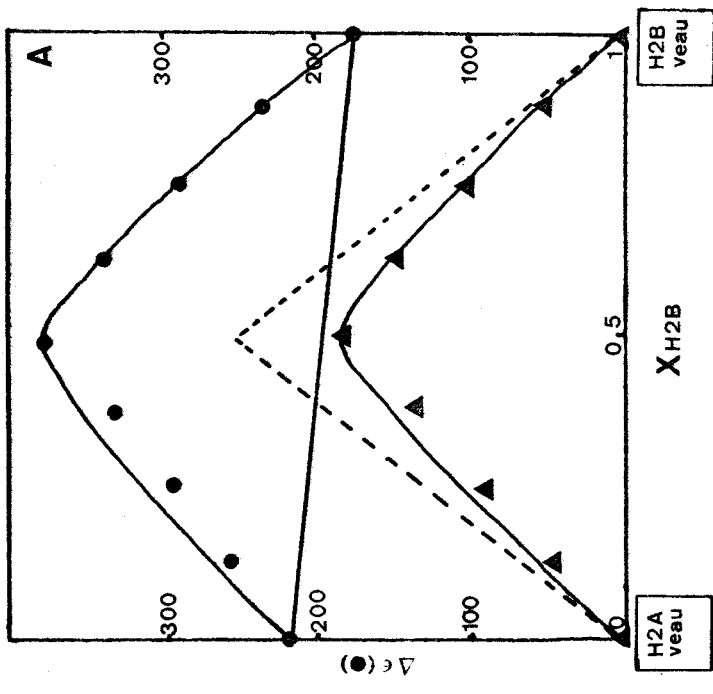


Figure 19

## 2 - 3-1-2 Cas de l'histone H2B de Seiche

S'il est facile de comprendre pourquoi une réduction doit être faite dans le cas de l'histone H3 lors de son interaction avec H4 (l'histone H3 possède 1 ou 2 cystéines) on conçoit mal la nécessité de la réduction de l'histone H2B de Seiche pour qu'elle puisse interagir avec une histone H2A : en effet, l'histone H2B de Seiche ne contient pas de cystéine.

Elle renferme par contre une méthionine et il n'est pas impossible de penser que ce résidu est susceptible d'être oxydé.

Cependant, si l'on compare les compositions en acides aminés des histones H2B de Seiche et de Veau, on peut remarquer que les deux histones H2B contiennent ces résidus de méthionine. Or, l'histone H2B de Veau ne nécessite pas de réduction préalable pour interagir avec une histone H2A.

Le cas de l'histone H2B de Seiche n'est pas unique et un cas semblable a été cité dans la littérature : il s'agit de l'histone H2B de Pois (128). Cette dernière a été plus spécialement étudiée. En particulier, lorsqu'elle n'est pas réduite, il a été démontré que sa migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de Triton X 100 était beaucoup plus rapide que celle observée pour d'autres histones H2B (128). Cette différence de comportement entre les formes réduite et oxydée n'est observable qu'en présence de Triton. En milieu urée-acide acétique ou SDS, sa vitesse de migration est voisine de celle des autres histones H2B. Ce comportement anormal a été observé également pour l'histone H2B de drosophile (3). ALFAGEME *et al* (3) ont suggéré que cette migration rapide pouvait s'expliquer par une modification intervenue sur l'histone au cours de sa préparation: la méthionine serait oxydée en méthionine sulfoxyde, diminuant ainsi la liaison de l'histone au Triton.

Pour une raison qui nous échappe, cette réaction d'oxydation ne se produirait pas sur l'histone H2B de Veau ; ce qu'il nous est impossible d'expliquer car les procédés utilisés lors

de la préparation des histones de Veau et de Seiche sont semblables. Plusieurs hypothèses peuvent cependant être avancées :

- On peut supposer que la conformation des deux histones est différente et que lors de la préparation les méthionines ne sont pas accessibles de la même manière à l'agent oxydant dans l'une et l'autre molécule.

- On peut supposer également que l'oxydation des méthionines n'est pas un "artefact" de préparation et qu'elles existent réellement sous forme oxydée dans la cellule. Il faudrait alors vérifier si ce type d'oxydation est physiologique ou non. S'il s'agit d'une spécificité donnée de l'histone H2B, on voit mal du point de vue biologique le point commun qui pourrait exister entre des histones H2B isolées de tissus et d'espèces aussi différentes que le testicule de Seiche, l'embryon de Drosophile (40) et le Pois (128). Il faut noter toutefois que dans ce tissu particulier du testicule, une histone H2B isolée chez le Rat présente des propriétés différentes de l'histone H2B extraite des cellules somatiques de ce même animal (119).

Afin d'obtenir un renseignement supplémentaire sur le comportement de notre histone H2B de Seiche dans les complexes H2A-H2B, nous avons tenté de calculer la constante d'association K des complexes homologues et hétérologues .

## 2 - 3-2 Calcul de la constante d'association

Au maximum de l'interaction, c'est-à-dire à l'équimolarité ( $X_B = 0,5$ ), on peut déduire la constante d'association K d'un mélange.

Une constante d'association mesure l'équilibre qui existe entre le complexe et ses produits de dissociation et mesure par conséquent la force des interactions qui maintiennent ce complexe.

Ce type de calcul revient à déterminer dans le signal expérimental observé, la contribution du complexe H2A-H2B de celle de ses produits de dissociation H2A et H2B. Les courbes de variations continues permettent de connaître la valeur du signal que



l'on aurait observé si la réaction avait été totale. En effet, en extrapolant les pentes initiales aux fractions molaires 0 et 1 (en ces deux points seulement, la réaction étant effectivement totale) on obtient la valeur du signal correspondant à 100 p.100 du complexe.

La valeur extrapolée intervient donc de façon significative dans le calcul de K. En absence de toute indication concernant l'extrapolation des pentes et pour éviter tout caractère arbitraire au tracé de ces pentes, nous avons utilisé pour toutes les courbes expérimentales la même méthode : celle de la dérivée du polynôme de NEWTON. Un exemple de ce calcul des pentes est donné dans le cas du complexe hétérologue Seiche/Veau (Tableau VI).

On constate que le point d'intersection entre les deux tangentes ne se situe pas exactement à l'équimolarité. Nous avons cependant pris comme valeur du signal du complexe ce point d'intersection. L'erreur faite sur cette détermination est évaluée à partir des deux valeurs extrêmes de l'intersection de chacune des tangentes avec la droite d'abscisse 0,5 (Figure 19, A, C, E, F).

Les valeurs de K ainsi obtenues pour les différents complexes H<sub>2</sub>A-H<sub>2</sub>B sont rassemblées dans le tableau ci-dessous :

H <sub>2</sub> A-H <sub>2</sub> B	K x 10 <sup>-6</sup> (mole <sup>-1</sup> )
Veau/Veau	3,55 ± 0,05
Seiche/Veau	2,50 ± 0,30
Veau/Seiche	1,55 ± 0,45
Seiche/Seiche	1,05 ± 0,45

TABLEAU VI

DETERMINATION DES PENTES AUX FRACTIONS MOLAIRES 0 ET 1 DANS LE  
CAS DU COMPLEXE H2A SEICHE - H2B VEAU

X	b	$\Delta b$	$\Delta^2 b$	$\Delta^3 b$	$\Delta^4 b$	$\Delta^5 b$
0	0					
		25				
0,05	25		-3			
		22		0		
0,10	47		-3		+3	
		19		+3		-7
0,15	66		0		-4	
		19		-1		
0,20	85		-1			
		18				
0,25	103					

X	b	$\Delta b$	$\Delta^2 b$	$\Delta^3 b$	$\Delta^4 b$	$\Delta^5 b$
1	0					
		25				
0,95	25		-1			
		24		-2		
0,90	49		-3		+1	
		21		-1		+4
0,85	70		-4		+5	
		17		+4		
0,80	87		0			
		17				
0,75	104					



## 2 - 3-3 Variation de l'énergie libre lors de la formation des complexes

Ces valeurs de K permettent de calculer la variation d'énergie libre,  $\Delta G$ , lors de la formation du complexe comme l'on fait précédemment ISENBERG et son équipe (129). Comme ces auteurs le mentionnent, il faut avoir présent à l'esprit le fait que de grandes différences de K impliquent de faibles différences seulement de la variation de l'énergie libre car la relation qui lie ces deux valeurs est logarithmique :

$$\Delta G = RT \text{ Log } K$$

Si l'on considère les valeurs de K obtenues pour les différents complexes, la différence de l'énergie libre entre les complexes correspondant à la plus grande et à la plus petite valeur de K (Veau/Veau, Seiche/Seiche) est donnée par :

$$\Delta (\Delta G) = RT \text{ Log } \frac{3,55}{1,05} = 0,7 \text{ KCal/mole}$$

Si l'on considère la variation d'énergie libre mise en jeu lors d'une interaction méthyl-méthyl (environ 0,5 KCal/mole) ou lors d'une interaction méthyl-hydrogène (environ 0,3 KCal/mole) la différence  $\Delta (\Delta G)$  que nous venons de calculer pour les deux types de complexes (Veau/Veau, Seiche/Seiche) apparaît minime.

Nous pourrions donc conclure comme l'on fait pour d'autres espèces ISENBERG et son équipe, que la force des interactions qui maintient H2A et H2B en dimère est semblable dans le thymus de Veau et dans le testicule de Seiche. Les surfaces d'interaction étant en outre les mêmes à un ou deux résidus près dans les complexes homologues et hétérologues.

En étudiant ainsi des espèces situées dans des règnes différents : animaux (27), végétaux (128), champignons (82), les auteurs ont pu conclure qu'en dépit des différences existant dans la séquence des histones impliquées, les interactions avaient été étroitement conservées au cours de l'évolution.

Nous serions tentées d'effectuer le même raisonnement dont la conséquence biologique apparaît tout à fait raisonnable dans la mesure où le nucléosome est une structure fondamentale commune à toutes les chromatines. Cependant, nous nous sommes heurtées d'un point de vue physico-chimique à la signification du calcul de la constante d'association  $K$ .

## 2 - 3-4 Limites de la méthode

Tout d'abord, nous nous sommes demandée comment les pentes initiales avaient été extrapolées par l'équipe d'ISENBERG (27) pour des histones qui interagissent (H2A et H2B par exemple) et des histones qui n'interagissent pas (H2A et H4 par exemple). Il nous a semblé que contrairement aux auteurs, il fallait nous astreindre à toujours extrapoler ces pentes de la même manière et pour toutes les courbes (calcul de NEWTON).

Il reste cependant que, quelle que soit la méthode utilisée, le tracé dépend de la courbe expérimentale : en particulier, il nous semble que le calcul de  $K$  n'a aucun sens pour des interactions nulles ou très faibles (Figure 19, B, D). En effet, dans les courbes expérimentales, deux paramètres interviennent : la constante d'association  $K$ , mais également  $\Delta\epsilon_{AB} - \Delta\epsilon_N$  qui traduit l'augmentation de l'hélicité lorsque le complexe se forme.

Un exemple expérimental correspondant à un cas d'interaction faible ou nulle est celui de l'essai de recombinaison avec l'histone H2B de Seiche non réduite (Figure 19, B, D). La différence  $\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_N$  est extrêmement faible et l'intersection des tangentes donne une valeur extrapolée également très faible. Cette valeur extrapolée faible correspond cependant à 100 p.100 de complexe AB de sorte que le pourcentage de complexe AB à l'équilibre, calculé à partir de la valeur expérimentale observée est relativement grand et en contradiction évidente avec une interaction faible.

Il semblerait donc que la valeur de  $K$  ne puisse être déterminée que lorsque les interactions ont une certaine importance

ce qui est le cas pour les complexes hétérologues (l'histone H2B de Seiche étant réduite) et pour le complexe homologue de Veau. Le complexe homologue de Seiche (histone H2B réduite) correspond quant à lui à un cas intermédiaire.

A la limite, on peut même se demander comme GLOVER et GOROVSKY (48), si le calcul de  $K$  lui-même a un sens : ces auteurs, se donnant des valeurs de  $K$  et de  $\Delta\epsilon_{AB}$ , recalculent la courbe des variations continues qu'ils devraient obtenir : ils constatent que pour des couples de valeurs  $K$ ,  $\Delta\epsilon_{AB}$  très différentes, les courbes simulées sont semblables. De la même façon, lorsque deux intersections diffèrent, ils ne peuvent conclure si cela est dû à une variation de  $K$  ou de  $\Delta\epsilon_{AB}$ , ou de ces deux paramètres.

Par conséquent, la différence d'interaction que l'on observe entre les complexes homologues de Veau et de Seiche ne peut être attribuée sans ambiguïté à une différence de  $\Delta\epsilon$  du complexe ou à une variation de  $K$ .

#### 2 - 4 CONCLUSION

Malgré toutes les réserves que nous avons émises concernant la détermination et la signification de  $K$ , la méthode des variations continues reste une méthode extrêmement sensible de mise en évidence d'interactions entre deux histones.

Elle nous a permis de montrer que les histones H2A et H2B interagissaient l'une avec l'autre à condition toutefois que l'histone H2B de Seiche soit préalablement réduite. Ceci implique un rôle décisif pour l'histone H2B lors de la recombinaison.

Si l'on admet que la réduction de l'histone H2B de Seiche met en jeu les résidus méthionine présents dans cette molécule il faut admettre alors que la région où se situe ces méthionines ou les méthionines elles-mêmes jouent un rôle particulier lors de l'interaction avec l'histone H2A. La détermination de la séquence devrait permettre d'émettre une hypothèse concernant les domaines d'interaction.

La spécificité de comportement de l'histone H2B de Seiche serait en outre intéressante à étudier en comparant les séquences des histones H2B de Veau et de Seiche. A la lumière des résultats obtenus par hydrolyse trypsique de la molécule, on constate quelques différences entre les cartes peptidiques. Il n'est pas impossible de penser qu'elles traduisent des différences au niveau de la séquence et que ces différences ont une répercussion au niveau de la conformation. Rappelons également le fait que les deux histones H2B considérées sont isolées de deux tissus différents et que ceci pourrait expliquer leur différence de comportement.

## CHAPITRE 3

ETUDE DES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE PAR SPECTROSCOPIE  
DIFFERENTIELLE

La méthode de dichroïsme circulaire ne permettant d'obtenir que des renseignements globaux sur la conformation de la protéine totale, nous nous sommes intéressée à une méthode qui puisse donner des renseignements sur des régions bien déterminées de la molécule. Nous avons donc choisi d'étudier les variations enregistrées au niveau d'un acide aminé déterminé, en l'occurrence la tyrosine, par la méthode de spectroscopie différentielle.

En effet, des changements faibles mais significatifs du spectre d'adsorption U.V. d'une protéine peuvent être observés lorsque ces dernières sont soumises à une perturbation thermique légère et progressive. En particulier, les variations spectrales enregistrées entre 270 et 300 nm sont caractéristiques des résidus tyrosine exposés et peuvent être quantifiées (10, 93).

Cette méthode mise au point au laboratoire par J.P.AUBERT nous a permis d'étudier l'accessibilité des résidus tyrosine au sein d'une molécule d'histone ou d'un complexe d'histones, et de déduire ainsi l'état conformationnel et l'engagement au sein de ces complexes des régions avoisinant chacun de ces résidus tyrosine.

Nous avons donc étudié les histones H2A, H2B, H3 et H4, les complexes d'histones H2A-H2B et  $(H3-H4)_2$  ainsi que l'octamère d'histones  $(H2A-H2B-H3-H4)_2$ .

### 3 - 1 RAPPELS THEORIQUES

#### 3 - 1-1 Principe

Des modifications du spectre d'adsorption U.V. d'une protéine peuvent se produire sous l'effet d'une perturbation chimique (solvant, pH) ou physique (température) de la solution. Ces modifications mesurées par spectroscopie différentielle résultent de la perturbation des chromophores exposés au solvant. Les chromophores qui sont enfouis à l'intérieur de la protéine ne sont pas affectés.

La perturbation des résidus tyrosine et tryptophane est enregistrée entre 270 et 300 nm. La perturbation des autres chromophores, phénylalanine, histidine, cystine peut également être enregistrée mais dans un domaine de longueurs d'onde plus lointain (210-240 nm). Dans le cas des histones, qui ne contiennent pas de tryptophane, les informations recueillies entre 270 et 300 nm sont spécifiques des résidus tyrosine.

Lorsque la perturbation n'affecte pas la conformation de la protéine (c'est le cas lors d'une perturbation thermique légère et progressive), les chromophores exposés au solvant peuvent alors être quantifiés.

#### 3 - 1-2 Détermination du nombre de résidus tyrosine exposés

Les mesures sont effectuées à la longueur d'onde  $\lambda_{\max}$  où la variation de l'absorption différentielle  $\Delta A$  en fonction de la température  $T$  est la plus forte.

Le nombre de résidus tyrosine exposés par mole est donné par le rapport des pentes  $\Delta \epsilon_{\lambda_{\max}}/T$  obtenues pour la protéine et le composé modèle N-acétyl-tyrosinamide (NAC-Tyr-NH<sub>2</sub>).

$\Delta \epsilon_{\lambda_{\max}}/T$  est la variation du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  pour une élévation de température de 1°C. Ce paramètre est obtenu à partir des valeurs observées  $\Delta A$  reportées à la longueur d'onde étudiée en fonction de la température  $T$ .



### 3 - 2 PARTIE EXPERIMENTALE

#### 3 - 2-1 Préparation des solutions

La NAc-Tyr-NH<sub>2</sub> a été dissoute directement dans une solution de NaF 0,2M pH 7,0 ou NaCl 2M pH 7,5. Après centrifugation, la concentration a été déterminée par absorption U.V. à 275 nm. (37).

Les histones individuelles, le dimère H2A-H2B ainsi que le tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> ont été dissous dans une solution d'urée 7M, HCl 10<sup>-2</sup>M à raison de 4 mg/ml. En présence d'histone H3, du 2-mercapto-éthanol 5 p.100 a été ajouté à la solution. Après une nuit à température ambiante, les solutions ont été dialysées contre HCl 10<sup>-2</sup>M, puis additionnées d'un volume égal de NaF 0,4M pH 7.

L'octamère des quatre histones préparé sur colonne de Sephadex G-100 en milieu NaCl 2M pH 7,5 (chapitre 1 pp.57 à 61) a été étudié directement par spectroscopie U.V. différentielle.

La concentration a été déterminée dans chacun des cas par absorption U.V. à 274,5 nm (voir appendice technique).

#### 3 - 2-2 Mesures de l'absorption différentielle

Les spectres différentiels sont enregistrés sur un spectrophotomètre classique à deux faisceaux, dans deux cellules en quartz de 1 cm. La cellule de référence est maintenue à 5°C ou à 20°C. Une perturbation thermique est créée dans la seconde cellule. L'augmentation de la température se fait progressivement par palier de 5°C ou de 2°C suivant l'échantillon d'histone étudié. La température de la solution est contrôlée par une sonde en platine.

Les spectres différentiels sont enregistrés pour une sensibilité de l'appareil de 0,2, 0,1 ou 0,05.

### 3 - 3 RESULTATS ET DISCUSSION

Les histones et les complexes d'histones H2A-H2B et (H3-H4)<sub>2</sub> ont été étudiés dans une solution de NaF 0,2M à pH 7,0. L'octamère d'histones a été étudié à une force ionique plus élevée, en solution dans NaCl 2M à pH 7,5.

Afin de pouvoir chiffrer le nombre de résidus tyrosine exposés, il nous faut connaître tout d'abord le paramètre  $\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/T$  d'un seul résidu tyrosine.

#### 3 - 3-1 Spectres différentiels du composé modèle

Les spectres différentiels de la NAc-Tyr-NH<sub>2</sub> constituent des standards. Ils sont caractéristiques de la perturbation thermique du résidu tyrosine dans un tampon donné et à un pH donné.

Ils ont été enregistrés pour le composé modèle en solution dans NaF 0,2M à pH 7,0 (Figure 20) et NaCl 2M à pH 7,5 (Figure 21). Les mesures ont été effectuées à 286 nm, longueur d'onde pour laquelle le pic différentiel  $\Delta A$  est majeur. Les pentes  $\Delta\epsilon_{286}/T$  sont obtenues à partir de  $\Delta A_{286}/T$ . Elles ont les valeurs suivantes :

$$\Delta\epsilon_{286}/T = 2,37 \text{ dans NaF } 0,2M \text{ pH } 7,0$$

$$\Delta\epsilon_{286}/T = 1,83 \text{ dans NaCl } 2M \text{ pH } 7,5$$

et sont utilisées pour le calcul du nombre de résidus tyrosine exposés dans les histones et les complexes d'histones.

On peut noter que l'augmentation de la température affecte le chromophore lui-même mais également les interactions solvant-soluté. NICOLA et LEACH (93) ont donné une interprétation des spectres différentiels ainsi obtenus lors de la perturbation thermique. Cette interprétation est donnée dans l'appendice technique.

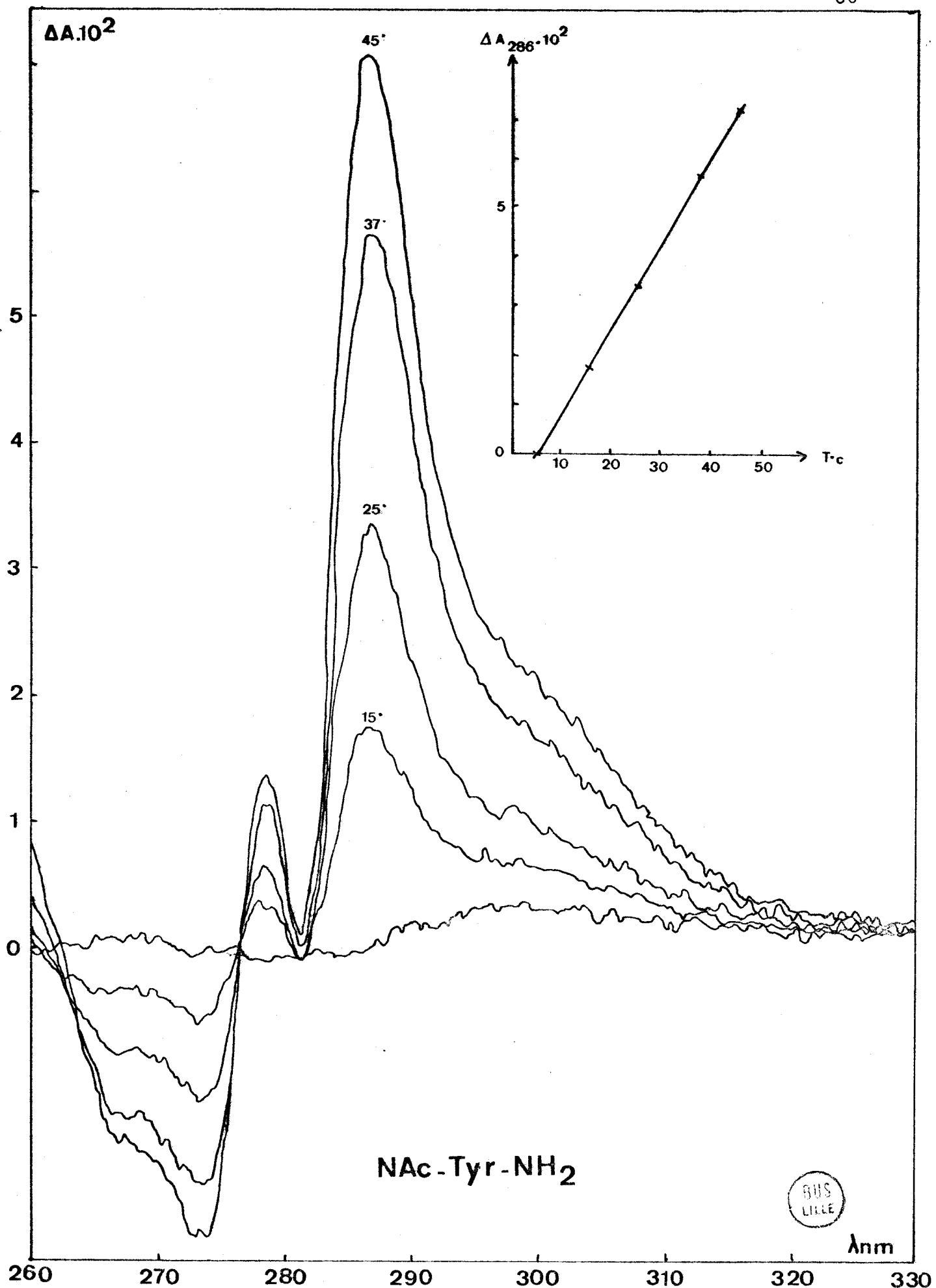


FIGURE 20 - Spectres différentiels de la NAc-Tyr-NH<sub>2</sub> dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c = 0,16$  mg/ml,  $s = 0,1$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

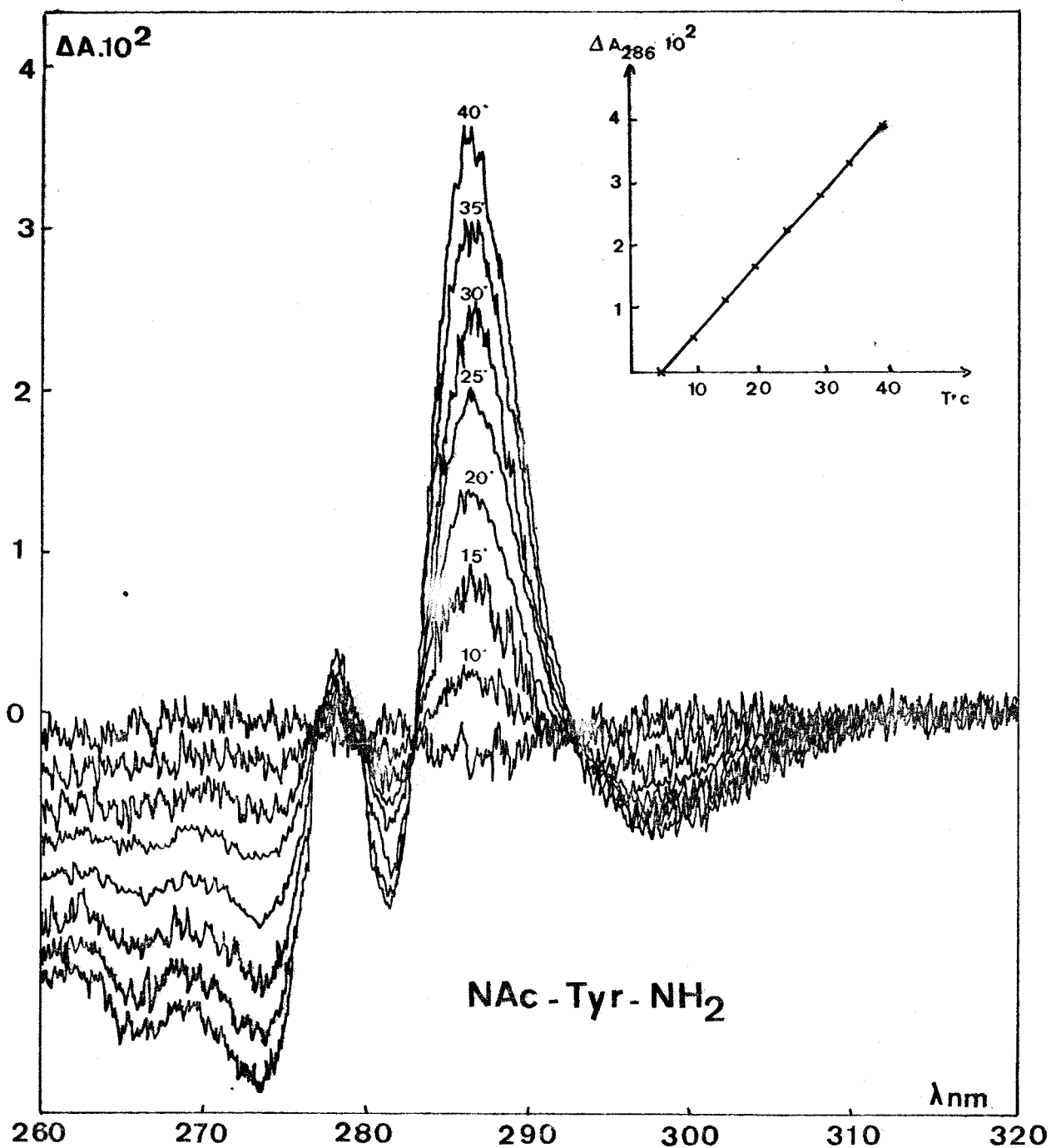


FIGURE 21 - Spectres différentiels de la NAc-Tyr-NH<sub>2</sub> dans NaCl 2M, pH 7,5 ( $c = 0,12$  mg/ml,  $s = 0,1$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

### 3 - 3-2 Application de la méthode aux histones et complexes d'histones

Les spectres différentiels des histones sont présentés figures 22 à 26. Les spectres différentiels du dimère H2A-H2B, du tétramère (H3-H4)<sub>2</sub> et de l'octamère (H2A-H2B-H3-H4)<sub>2</sub> sont présentés figures 29, 30 et 31.

#### 3 - 3-2-1 Analyse des spectres

On retrouve pour chaque échantillon un pic différentiel majeur qui apparaît entre 286 et 289 nm. A cette longueur d'onde,  $\lambda_{\max}$ , on reporte les valeurs  $\Delta A$  en fonction de T. La pente  $\Delta \epsilon_{\lambda_{\max}}/T$  obtenue à partir de  $\Delta A_{\lambda_{\max}}/T$  permet de calculer dans certaines limites que nous allons définir, le nombre n de résidus tyrosine exposés.

Dans ce type de mesures, il est évident que le calcul de n n'a un sens que s'il ne se produit pas de changements conformationnels de la molécule au cours de la perturbation. Ainsi, un changement de conformation de l'histone ou une agrégation de l'histone sur elle-même en fonction de la température entraîne dans les deux cas une erreur dans la détermination du nombre de tyrosines exposées. Cette erreur peut être évitée si la perturbation thermique est légère et progressive et si le calcul s'effectue dans une zone de température où les modifications de conformation et d'agrégation des histones ne surviennent pas encore. La représentation  $\Delta A_{\lambda_{\max}}$  en fonction de T nous indique nettement cette zone des températures, surtout dans le cas des histones H3 (figure 25), H4 (figure 26) et du complexe (H3-H4)<sub>2</sub> (figure 28). Cette représentation n'est en effet linéaire que jusqu'à une température donnée, au delà de laquelle on observe ensuite un changement très net de la pente  $\Delta A_{\lambda_{\max}}/T$ . Cette rupture de pente observée pour toutes les histones et les complexes d'histones (tableau VII) correspond selon nous à la modification de conformation ou à l'agrégation des molécules et nous fournit les limites où doit s'affectuer le calcul de n.

La présence d'une certaine turbidité dans la solution de départ (à 5°C) entraîne également une erreur sur la détermination du nombre de résidus tyrosine exposés. Ainsi, sur des échantillons anciens d'histone H4 présentant d'emblée à 5°C une certaine turbidité, la représentation pourtant linéaire des variations de l'absorption à 288 nm en fonction de la température a conduit à une surestimation évidente du nombre de résidus tyrosine exposés. Ceux-ci étaient en effet déterminés en nombre supérieur au nombre total des résidus tyrosine de la molécule. Afin d'éviter dans des cas moins évidents ce type d'erreur, nous avons dû introduire un critère supplémentaire pour une estimation correcte de  $n$ . Nous nous sommes intéressée en particulier au point à 276 nm qui dans le cas du composé modèle est toujours nul quelle que soit la température d'enregistrement. Nous avons choisi de ne pas tenir compte des expériences pour lesquelles on ne retrouvait pas dans le domaine de températures où s'effectue le calcul de  $n$ , ce point à 276-278 nm invariable et nul.

Les résultats concernant la détermination du nombre de résidus tyrosine exposés sont rassemblés dans le tableau VII. Nous proposons figure 32 une position dans la molécule pour ces différents résidus exposés. A la lumière des résultats obtenus à la fois sur les histones individuelles et les complexes d'histones, nous avons essayé d'obtenir des informations sur le rôle de chaque région avoisinant les résidus tyrosine.

### 3 - 3-2-2 Conformation des histones

#### - Histone H2A

Deux séries de spectres différentiels ont été réalisées pour l'histone H2A. Dans la première série (figure 22), la perturbation par la température est effectuée à partir de 5°C. La valeur de  $n$ , déterminée entre 5°C et 20°C (température de rupture de la pente  $\Delta A_{\lambda_{\max}}/T$  indique que deux tyrosines sur trois

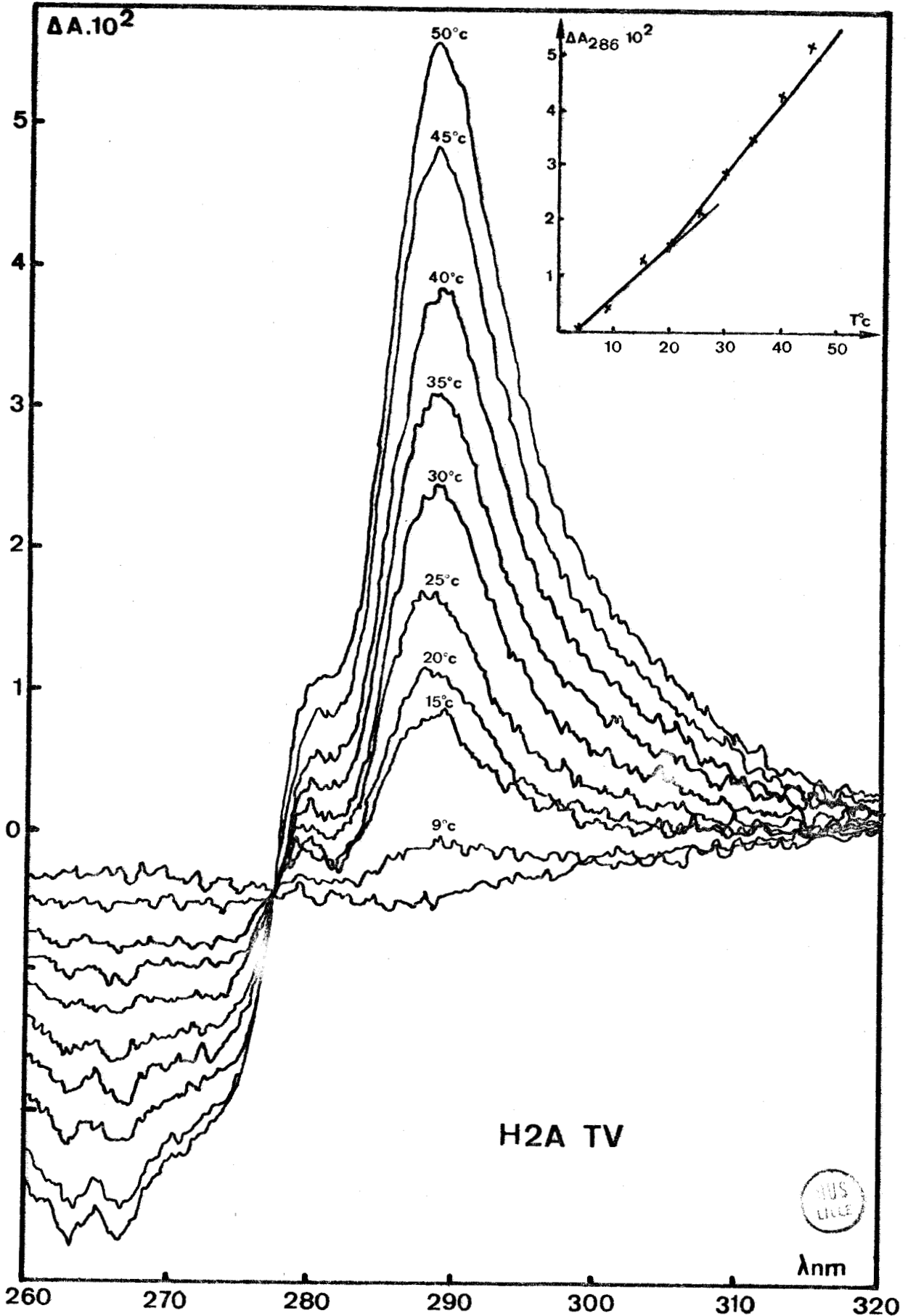


FIGURE 22 - Spectres différentiels de l'histone H2A dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c = 28$  mg/ml,  $s = 0,1$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

sont exposées (tableau VII). Dans la seconde série (Figure 23), la perturbation par la température est effectuée à partir de 20°C et le calcul de  $n$  entre 20°C et 50°C n'indique plus alors qu'une seule tyrosine exposée. Selon le domaine de températures considéré, les résidus tyrosine existent donc dans des environnements différents, la molécule adoptant des conformations différentes.

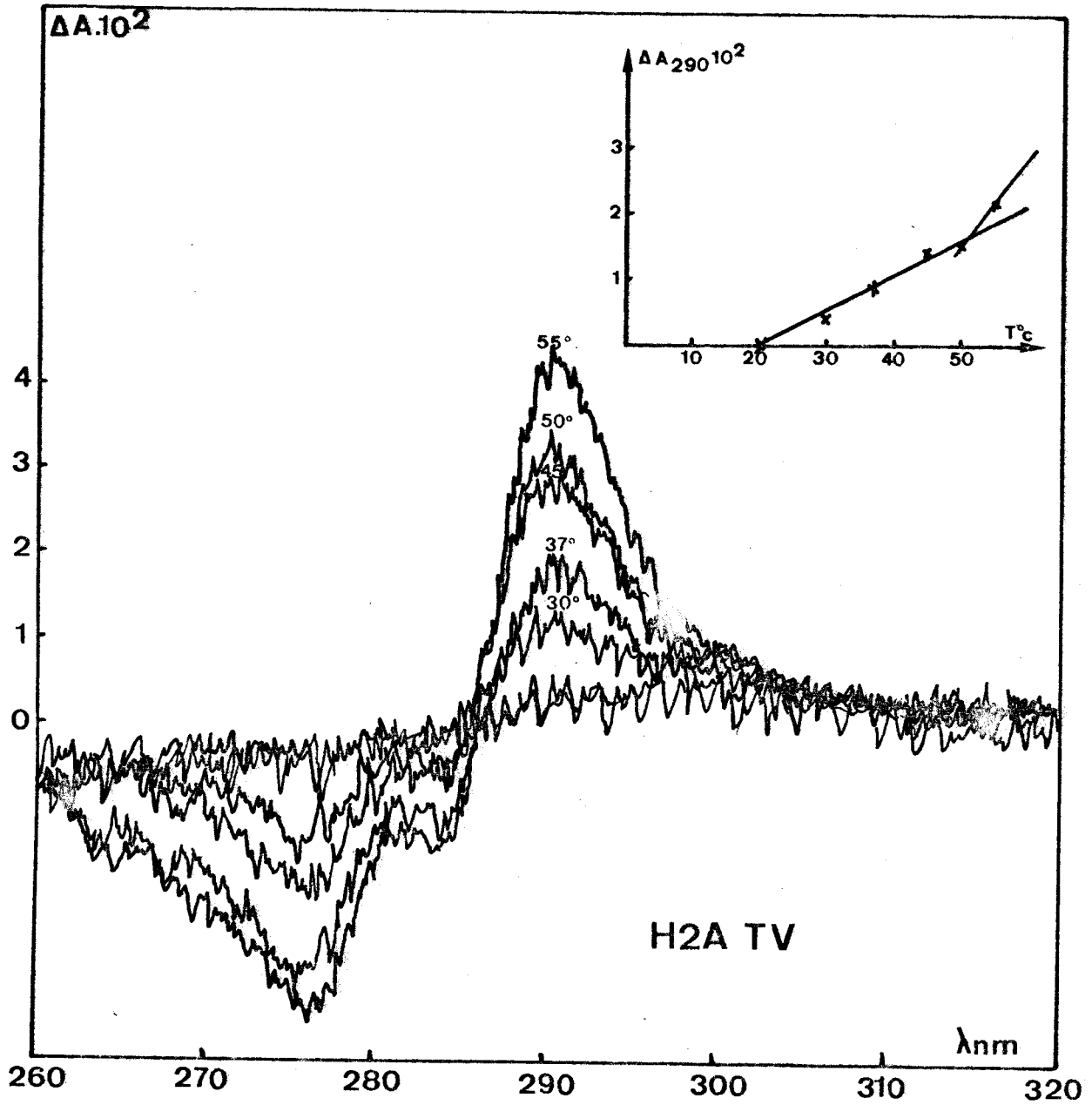
L'histone H2A comporte trois résidus tyrosine localisés en positions 39,50 et 57 (Figure 33). Les résultats obtenus par P.SAUTIERE *et al* lors des études de digestion de l'histone H2A native par la chymotrypsine (116) ont montré qu'il n'était pas possible d'obtenir des coupures au niveau des résidus tyrosine 50 et 57. Ce n'est qu'en maléylant la molécule que les auteurs ont pu rendre ces deux résidus accessibles à l'enzyme. Ce type d'expérience a été effectué à 37°C, dans un tampon bicarbonate d'ammonium pH 8,0. Elle permet de supposer que dans le domaine des températures 20° - 50°C, le seul résidu tyrosine exposé est le résidu 39. Il est localisé en outre à proximité d'un  $\beta$ -turn et dans une région inordonnée contrairement aux deux autres tyrosines 50 et 57 qui sont dans des régions hélicoïdales (41) (Figure 33).

Entre 4°C et 20°C, nous observons que deux résidus tyrosine sont exposés. L'un d'entre eux est sans doute le résidu 39 pour les raisons énoncées ci-dessus. Par contre, nous n'avons aucun élément qui nous permette d'attribuer la position 50 ou 57 au second résidu tyrosine exposé.

#### - Histone H2B

Les spectres différentiels de l'histone H2B sont présentés figure 24. L'histone H2B contient cinq résidus tyrosine localisés en positions 37,40,42,83 et 121 (Figure 33). Nos résultats indiquent que quatre d'entre eux sont exposés à la perturbation (Tableau VII). Il en résulte qu'un seul est enfoui à l'intérieur de la molécule. Ces résultats semblent en accord avec





BUS  
LILLE

FIGURE 23 - Spectres différentiels de l'histone H2A dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c \approx 2,7$  mg/ml,  $s = 0,2$ ). La cellule de référence est maintenue à 20°C .

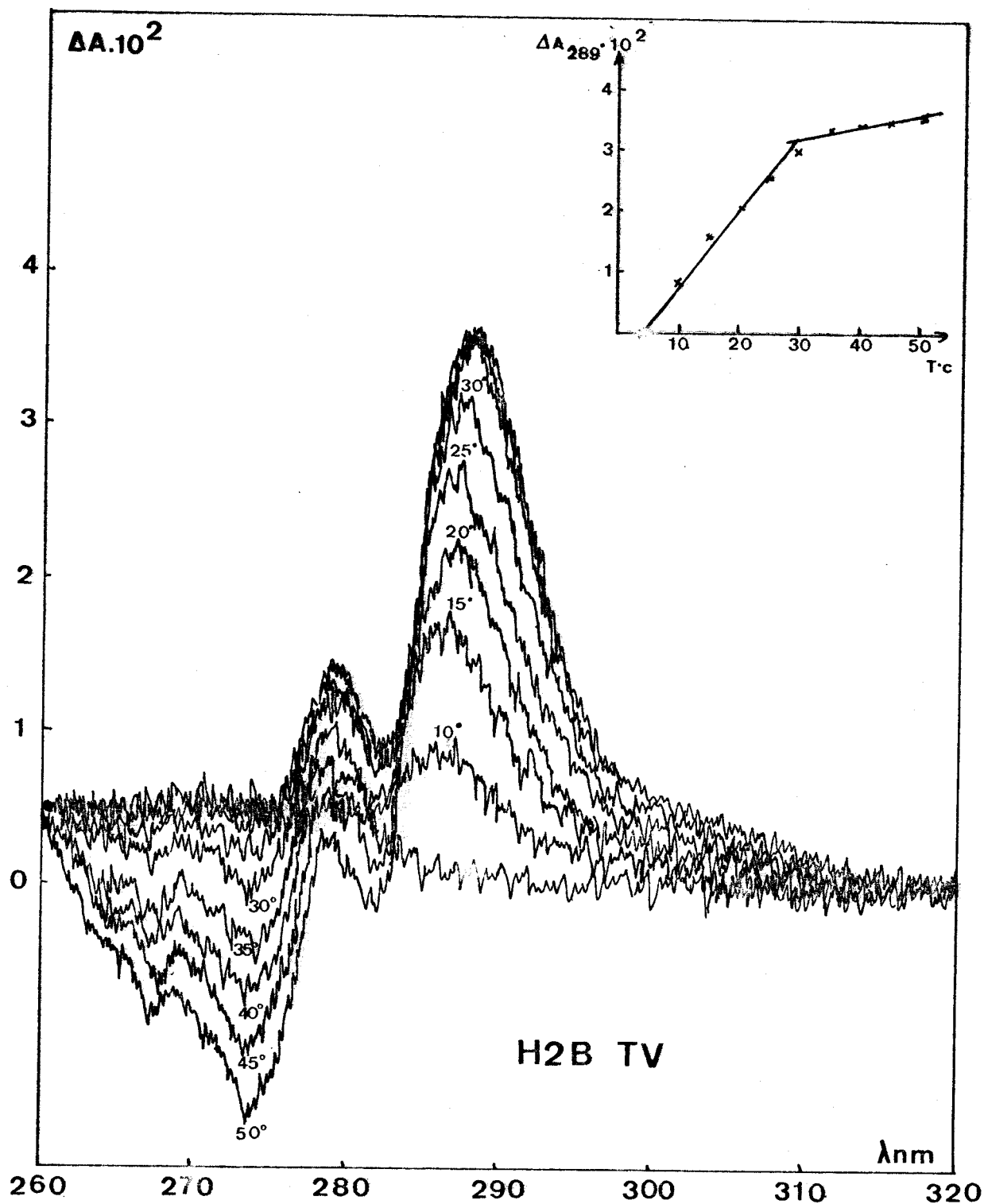


FIGURE 24 - Spectres différentiels de l'histone H2B dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c = 1,75$  mg/ml,  $s = 0,1$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

BUS  
LILLE

ceux obtenus par TANCREDI *et al* (134) et VAN HELDEN (142). Les premiers ont démontré par R.M.N. que la région 50 ( $\pm 5$ ) à 108 ( $\pm 5$ ) de l'histone H2B était peu mobile. Cette région ne comporte qu'un seul résidu tyrosine, en position 83. Elle exclut les résidus 37,40,42 et 121 qui constitueraient donc les quatre résidus tyrosine exposés. Les études de VAN HELDEN (142) par fluorescence ont montré également que le résidu tyrosine en position 83 était enfoui à l'intérieur de la molécule.

#### - Histone H3

En dépit de la turbidité évidente qui apparaît pour l'histone H3 dès 15°C (Figure 25), il a été possible de déterminer entre 5°C et 15°C que deux résidus tyrosine sur trois étaient exposés dans ces conditions à la perturbation thermique (Tableau VII). Un seul résidu tyrosine est donc enfoui à l'intérieur de la molécule. Ces résultats semblent en accord avec ceux obtenus par PALAU et PADROS (102). Les résidus tyrosine 41 et 54 qui sont localisés dans un environnement hydrophile seraient exposés au solvant alors que le troisième résidu tyrosine, en position 99, localisé en outre entre les deux résidus cystéine 96 et 110, serait enfoui à l'intérieur de la molécule (Figure 33).

#### - Histone H4

En ce qui concerne l'histone H4 (Figure 26), il a été possible de déterminer entre 5°C et 20°C que trois résidus tyrosine sur quatre étaient exposés dans ces conditions à la perturbation thermique (Tableau VII). Un seul résidu tyrosine est donc enfoui à l'intérieur de la molécule; ce qui semble en accord avec les résultats obtenus par LEWIS *et al* sur des peptides de l'histone H4 (75). L'étude par dichroïsme circulaire des différents peptides obtenus après clivage de la molécule

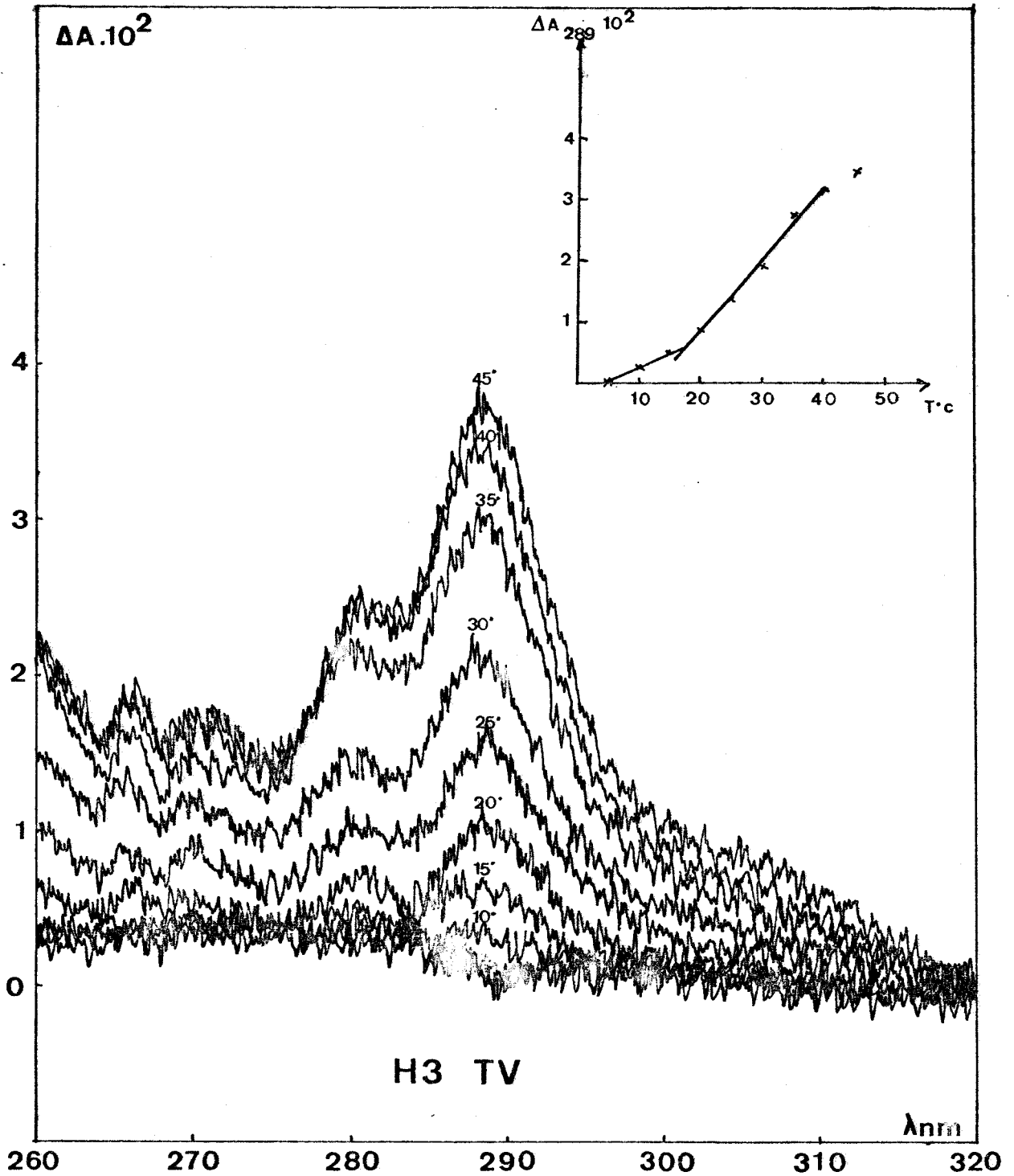


FIGURE 25 - Spectres différentiels de l'histone H3 dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c = 1,52$  mg/ml,  $s = 0,1$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

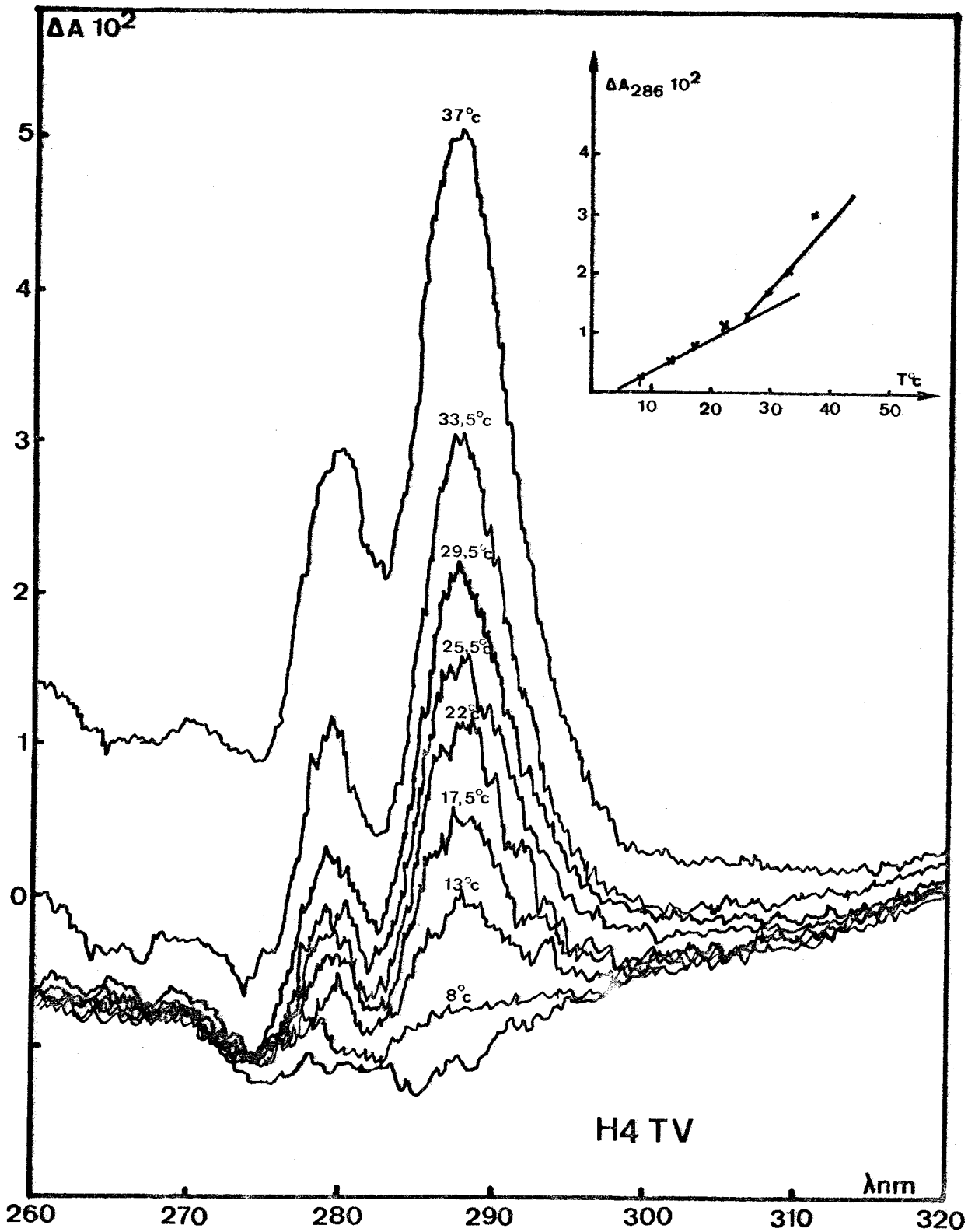


FIGURE 26 - Spectres différentiels de l'histone H4 dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c = 0,57$  mg/ml,  $s = 0,05$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

par l'acide acétique, a en effet montré que seul le peptide 25-67 était structuré. La région 25-67 ne comporte qu'un seul résidu tyrosine, en position 51 (Figure 33). Les trois autres résidus, en positions 72, 88 et 98 constitueraient donc les trois résidus tyrosine exposés.

### 3 - 3-2-3 Conformation des complexes d'histones

#### - Complexe H2A-H2B

Ainsi que le montre la figure 27, le complexe H2A-H2B en solution saline présente un contenu hélicoïdal élevé. L'augmentation de l'hélicité est caractéristique d'un dimère H2A-H2B et indique une interaction spécifique entre les deux histones (27, 65, 67, 92).

De la même manière que sur les histones individuelles, on peut noter une rupture de la pente  $\Delta A_{\lambda_{\max}}/T$  (Figure 29). Cette rupture de pente se produit toutefois pour une température plus élevée que dans les cas précédents (37°C). Ceci nous montre une stabilité des histones en fonction de la température plus grande dans le complexe que lorsque ces mêmes histones sont seules en solution. Dans le domaine 5°C-37°C, le calcul de  $n$  indique que trois résidus tyrosine sur huit sont exposés à la perturbation thermique (Tableau VII).

Les trois résidus qui restent exposés dans le dimère pourraient être les résidus 37 et 121 pour l'histone H2B et le résidu 39 pour l'histone H2A (Figures 32 et 33).

En effet, en ce qui concerne l'histone H2B, nous pensons que le résidu 121 qui appartient au tiers C-terminal de la molécule est plutôt impliqué dans les interactions avec l'histone H4, ainsi que l'ont suggéré les études de pontage (85). Le résidu 37, quant à lui, est situé dans un  $\beta$ -turn et a une probabilité plus grande d'être exposé que les résidus voisins en positions 40 et 42.

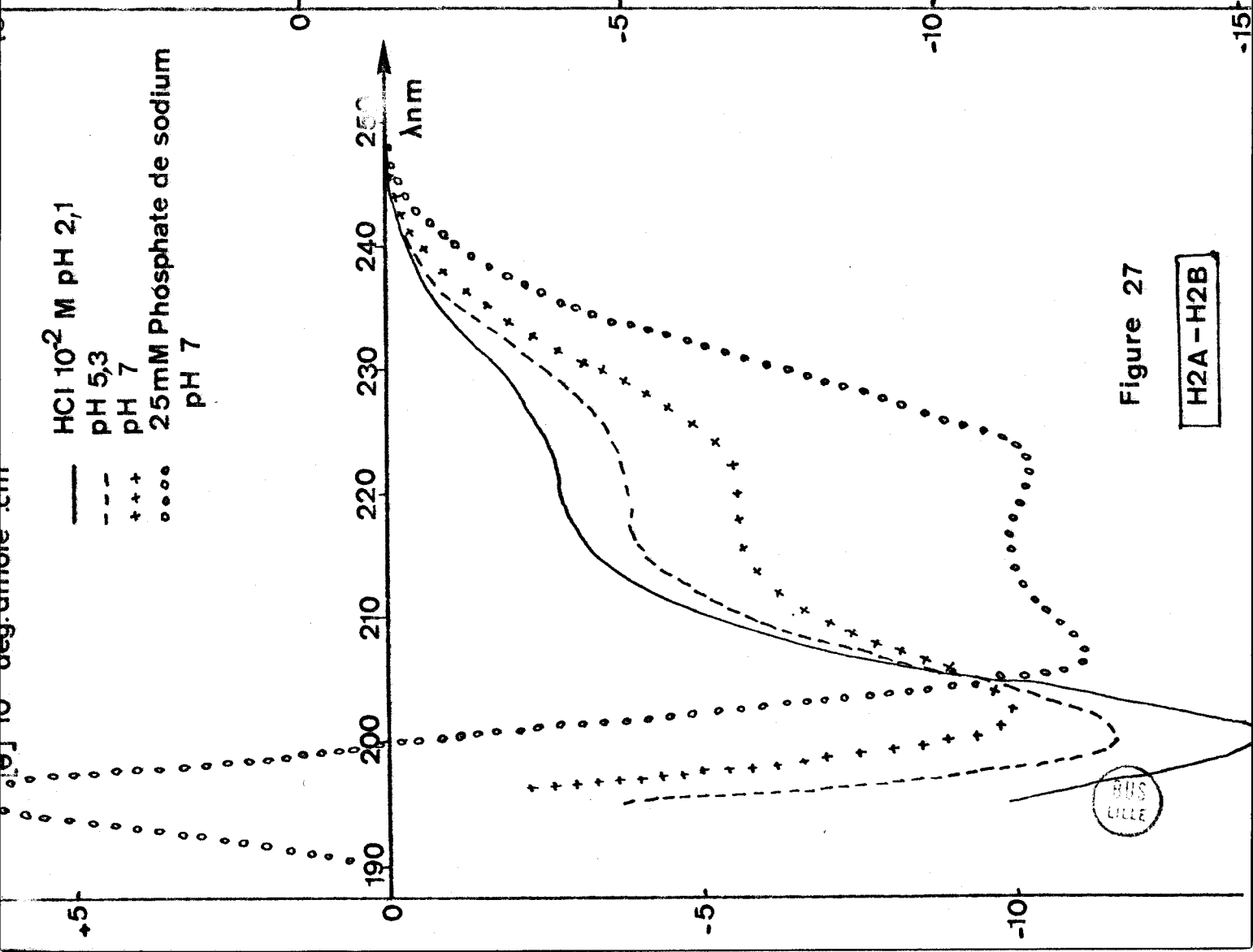


Figure 27

H2A - H2B

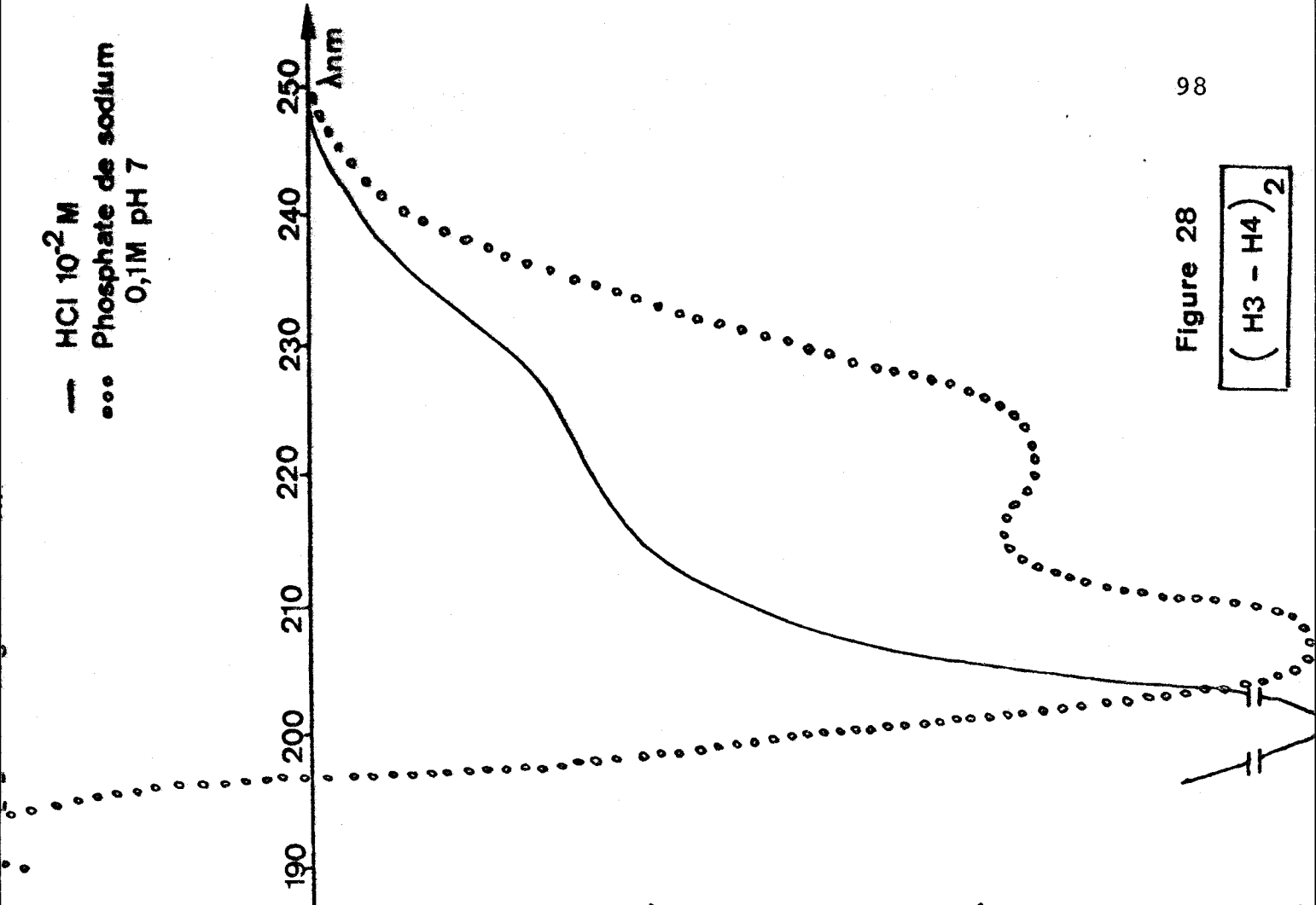


Figure 28

(H3 - H4)<sub>2</sub>

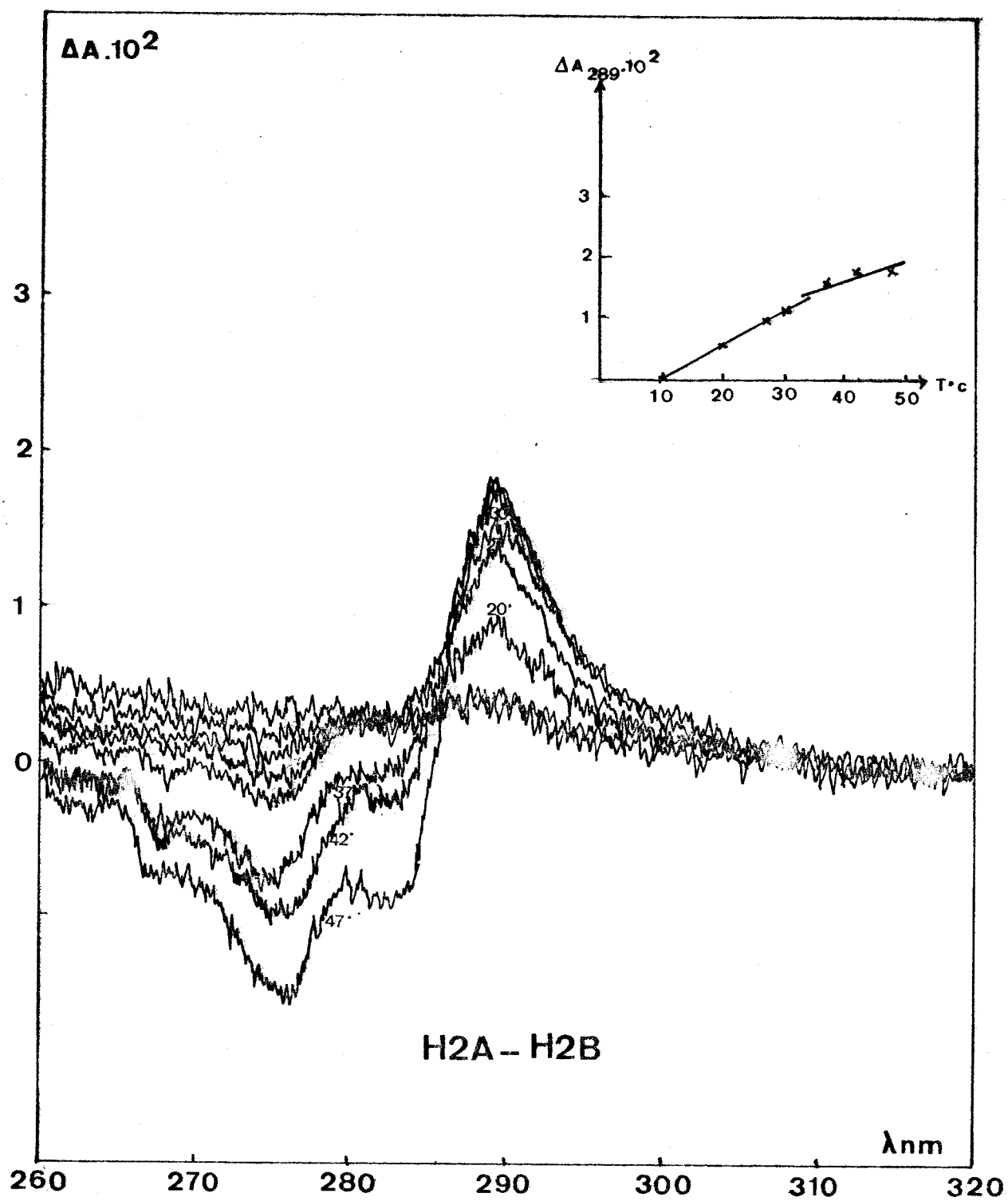


FIGURE 29 - Spectres différentiels du complexe H2A-H2B dans NaF 0,2M, pH 7,0 ( $c = 2,23$  mg/ml,  $s = 0,1$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.



En ce qui concerne l'histone H2A, nous pensons que le résidu tyrosine 39 reste exposé dans le dimère car il se situe à proximité d'un  $\beta$ -turn et dans une région inordonnée.

Cinq résidus tyrosine seraient par contre enfouis à l'intérieur du dimère, en positions 50 et 57 pour l'histone H2A, 40, 42 et 83 pour l'histone H2B. D'après des études en R.M.N, MOSS *et al* (87) ont suggéré que les régions 31-95 de l'histone H2A (qui inclut le résidu exposé en position 39) et 37-114 de l'histone H2B (qui exclut à la limite les résidus exposés 37 et 121), étaient impliquées dans le maintien du dimère H2A-H2B (31). Les résidus 40 et 42 de l'histone H2B semblent appartenir à des régions d'interaction avec l'histone H2A car DELANGE *et al* ont mis en évidence un pontage par les U.V. entre la tyrosine 37, 40 ou 42 de l'histone H2B et la proline 26 de l'histone H2A (31).

Par rapport aux histones individuelles H2A et H2B, la formation du dimère, "enfouit" trois résidus tyrosine supplémentaires : les résidus 40 et 42 de l'histone H2B et le résidu 50 ou 57 de l'histone H2A. On peut supposer que ces trois résidus appartiennent à des régions plus spécifiquement impliquées dans les interactions H2A-H2B.

- Complexe (H3-H4)<sub>2</sub>

En solution saline, les histones H3 et H4 forment un complexe équimoléculaire correspondant à un tétramère (113). Ainsi que le montre la figure 28, le complexe H3-H4 présente un contenu hélicoïdal élevé. L'augmentation de l'hélicité est caractéristique du complexe (H3-H4)<sub>2</sub> et indique une interaction spécifique entre les deux histones. A la concentration étudiée, seul le complexe préparé sur colonne a présenté ce critère d'interaction. En effet, un simple mélange des deux histones en solution dans HCl 10<sup>-2</sup>M fournit à cette concentration plus d'agrégats que de complexe lorsque l'on élève la force ionique.

Dans le cas du complexe H3-H4, les spectres différentiels obtenus (Figure 30) montrent que la rupture de la pente  $\Delta A_{\lambda_{\max}}/T$  survient aux environs de 30°C, à une température supérieure à celle notée pour les histones individuelles (respectivement 15°C et 20°C pour les histones H3 et H4). Dans le domaine 5°C-30°C, le calcul de  $n$  indique que les quatorze résidus tyrosine du complexe sont exposés dans le tétramère (Tableau VII). Aucun résidu tyrosine n'est donc impliqué dans le maintien de la structure du tétramère.

Ce résultat est surprenant car toutes les tyrosines (en positions 41,54 et 99 pour H3 et 51,72,88 et 99 pour H4) sont localisées dans les régions globulaires des molécules (Figure 33). En outre, BÖHM *et al* (11) ont démontré par des études de R.M.N sur différents peptides que les régions 42-120 de l'histone H3 et 38-102 de l'histone H4 étaient indispensables à la formation du complexe. Enfin, un tel résultat implique que des tyrosines initialement enfouies dans les histones individuelles (tyrosine 99 pour H3, tyrosine 51 pour H4) redeviennent accessibles au solvant lorsque le tétramère se forme et donc qu'un certain remaniement de la conformation des molécules se produit lorsque les deux histones sont mises en présence.

Nous ne pouvons expliquer la structure qui permet à tous les résidus tyrosine du complexe  $(H3-H4)_2$  d'être exposés à la perturbation thermique. Cependant, nous pouvons confirmer par ce résultat certaines observations faites notamment par EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (38). Ces auteurs ont démontré en effet que l'octamère d'histones constitué du tétramère  $(H3-H4)_2$  et de deux dimères H2A-H2B était maintenu par des liaisons hydrogène entre les deux types de complexe. Les études en fonction du pH leur ont permis de suggérer que ces liaisons hydrogène s'établissaient entre des résidus de tyrosine et d'histidine ou entre des résidus de lysine et d'histidine.

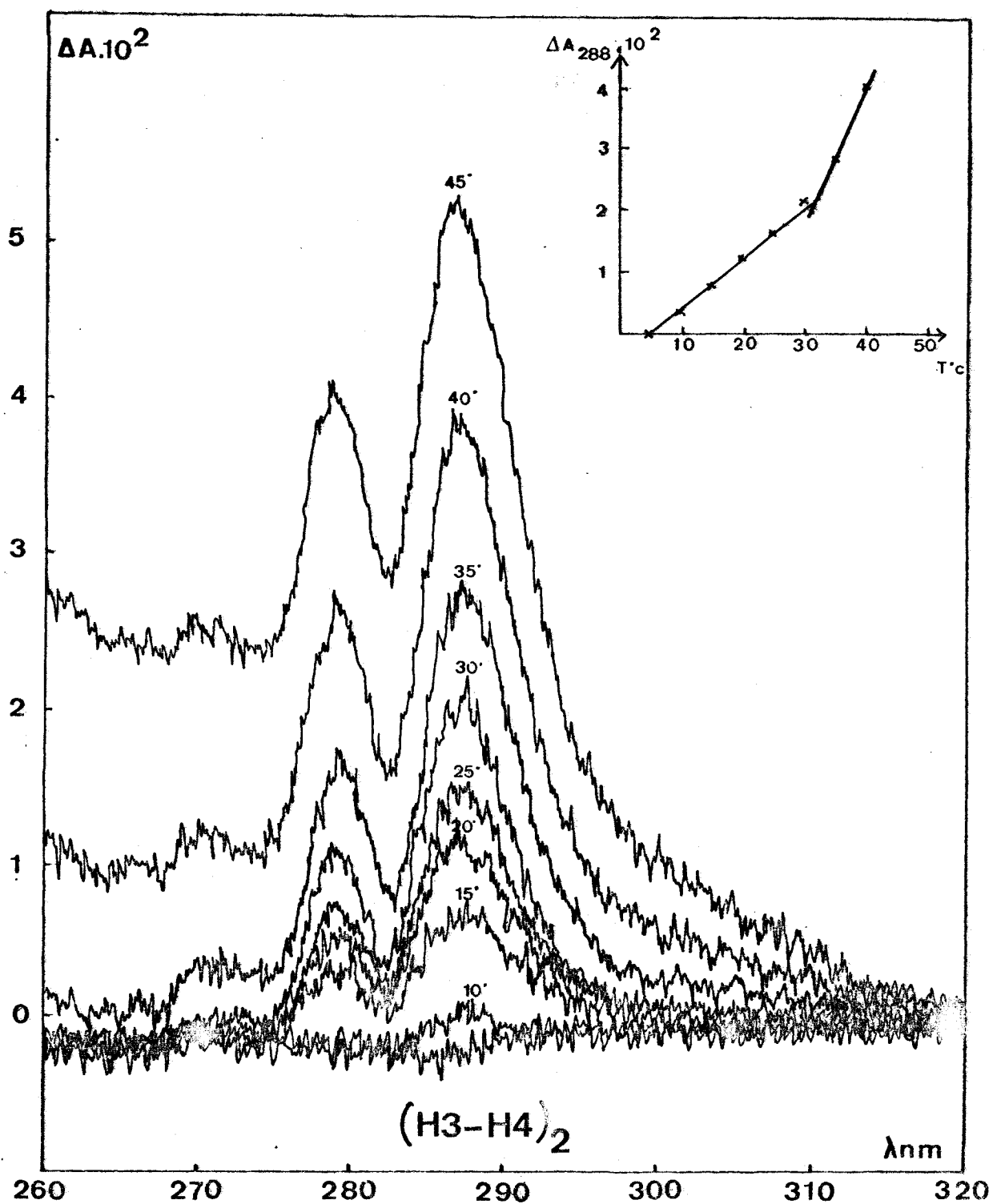


FIGURE 30 - Spectres différentiels du complexe  $(H3-H4)_2$  dans NaF 0,2M, pH 7,5 ( $c = 1,28$  mg/ml,  $s = 01$ ). La cellule de référence est maintenue à  $5^\circ C$ .

Afin de déterminer si les résidus tyrosine exposés avaient un rôle ou non dans le maintien de l'octamère, nous avons étudié l'octamère lui-même.

- L'octamère d'histones

L'octamère d'histones préparé dans les conditions décrites et discutées dans le chapitre 1 a été étudié à la sortie de la colonne en milieu NaCl 2M, pH 7,5 (Figure 31). Le spectre d'absorption U.V. qui précède toujours dans ce type de manipulations, l'enregistrement des spectres différentiels est présenté dans ce cas particulier. La solution est limpide et la turbidité pour un mélange des quatre histones à une telle force ionique est minime. La concentration en protéines dans la solution est de 0,5 mg/ml. La sensibilité de l'enregistrement est doublée par rapport à celle des expériences précédentes ( $s = 0,05$ ). Par rapport aux autres séries de spectres différentiels, il apparaît nettement dans les conditions utilisées, qu'à  $\lambda_{\max} = 286-289$  nm, entre 5°C et 13°C, l'absorption différentielle est nulle. Au delà de 13°C, on peut noter vers 288 nm, un faible pic différentiel. Vers 35°C, la turbidité apparaît. A 40°C, les histones précipitent.

Ces différents domaines de température 5°-13°C, 13°-35°C, 35°-40°C pourraient correspondre aux différents états d'association des quatre histones : octamère entre 5° et 13°C, complexes obtenus après dissociation de l'octamère entre 13° et 30°C et enfin entre 30° et 40°C, agrégation et précipitation des histones. Pour le complexe (H3-H4)<sub>2</sub>, ce phénomène d'agrégation est noté effectivement dès 30°C (tableau VII).

Ces phénomènes observés à plusieurs reprises devraient toutefois être confirmés pour une concentration plus grande en protéines. En outre, dans le domaine qui nous intéresse 5°-13°C, nous nous plaçons en fait dans des conditions limites où, à une ou deux tyrosines près, nous ne pouvons conclure que toutes les tyrosines sont enfouies à l'intérieur de l'octamère.

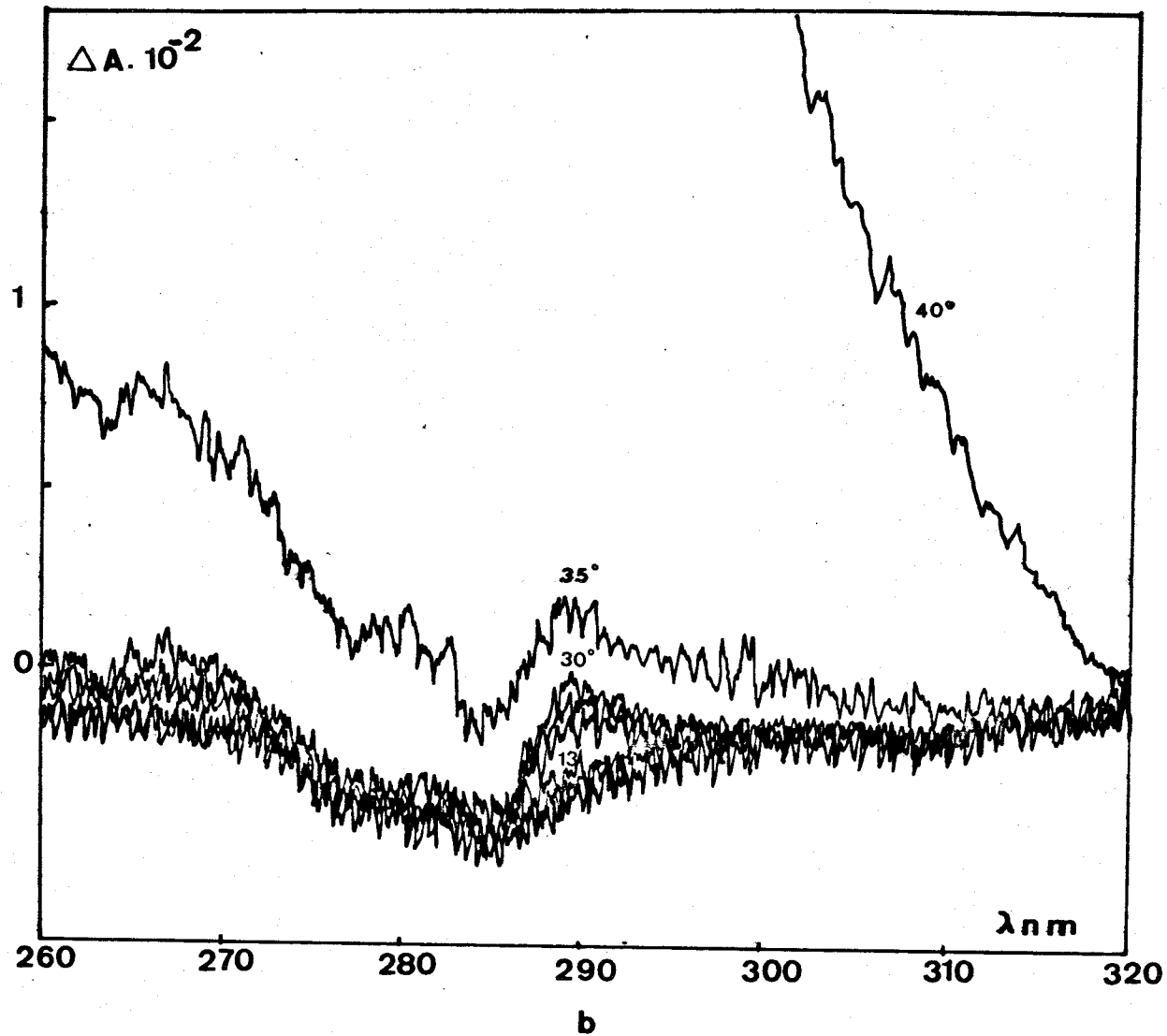
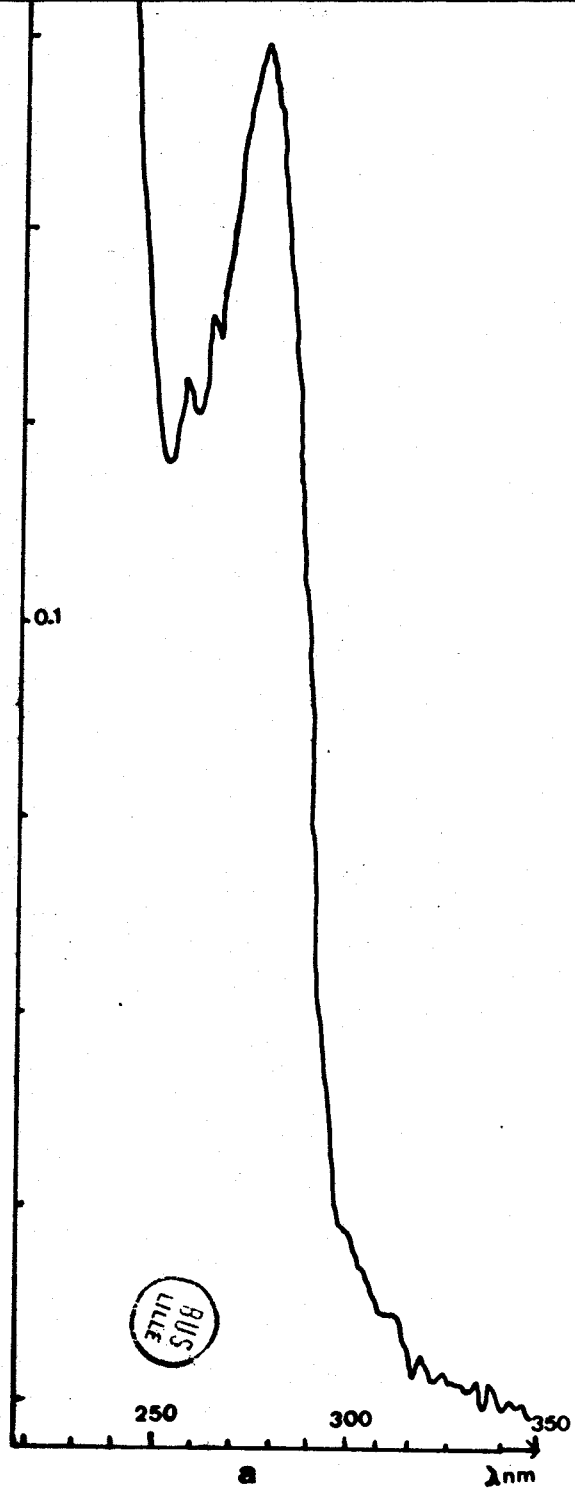


FIGURE 31 - Octamère d'histones dans NaCl 2M, pH 7,5 : a, spectre d'absorption U.V. à 5°C. b, spectres différentiels enregistrés à différentes températures ( $c = 0,5$  mg/ml,  $s = 0,05$ ). La cellule de référence est maintenue à 5°C.

Nous pouvons cependant affirmer qu'une grande partie sinon la totalité des quatorze résidus tyrosine exposés dans le tétramère  $(H3-H4)_2$  et des trois résidus tyrosine exposés dans le dimère H2A-H2B est enfouie à l'intérieur de l'octamère.

Ces résidus tyrosine pourraient être impliqués plus spécifiquement dans le maintien de l'octamère par l'intermédiaire de leur groupement hydroxylphénolique, pour établir ainsi que l'ont suggéré EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (38) des liaisons hydrogène avec des groupements aminés. Le fait que des résidus tyrosine puissent être impliqués dans des liaisons hydrogène au sein des "core histones" a d'ailleurs été démontré par d'autres auteurs sur les "core histones" elles-mêmes ou sur la chromatine, par d'autres techniques : spectroscopie raman (137) et spectroscopie ESR après marquage des tyrosines (19). Il est intéressant de noter que dans un résidu tyrosine, le groupement hydroxylphénolique apparaît en fait aussi important que le noyau aromatique hydrophobe généralement seul considéré.

Il faut noter également que si notre résultat se confirmait pour une sensibilité plus grande de l'enregistrement, plus aucune tyrosine ne serait exposée dans l'octamère. L'hypothèse d'interaction entre tyrosine et bases du DNA (86) lors de l'interaction histones-DNA apparaîtrait alors peu probable.

A la lumière des résultats obtenus à la fois sur les histones individuelles et sur les différents complexes d'histones, nous avons déduit l'état conformationnel des tyrosines ou des régions avoisinant les tyrosines dans l'octamère d'histones (Figure 33).

De telles déductions ne peuvent être faites que si l'on admet que la conformation des molécules dans les complexes H2A-H2B est la même que celle qui existe dans l'octamère d'histones. Un certain nombre d'études semble indiquer que l'octamère d'histones est effectivement formé d'un tétramère  $(H3-H4)_2$  auquel se trouvent associés deux dimères H2A-H2B. (38,50,66,138)

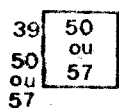
TABLEAU VII

## DETERMINATION DU NOMBRE DE RESIDUS TYROSINE EXPOSES

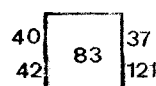
	HISTONES INDIVIDUELLES				COMPLEXES	
	H2A	H2B	H3	H4	H2A-H2B	(H3-H4) <sub>2</sub>
Température de rupture de pente	20°	30°	15°	25°	37°	30°
$\Delta\epsilon_{\lambda_{\max}}/T$	4,75	9,91	4,83	7,49	7,57	34,08
Tyrosines exposées	2,00	4,18	2,04	3,16	3,19	14,38
Tyrosines totales	3	5	3	4	8	14

## HISTONES

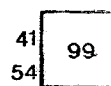
## INDIVIDUELLES



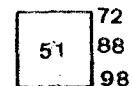
H2A



H2B



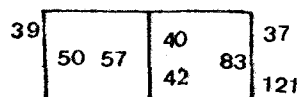
H3



H4

## COMPLEXES

## D'HISTONES



H2A - H2B

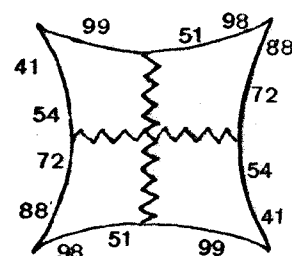
(H3-H4)<sub>2</sub>

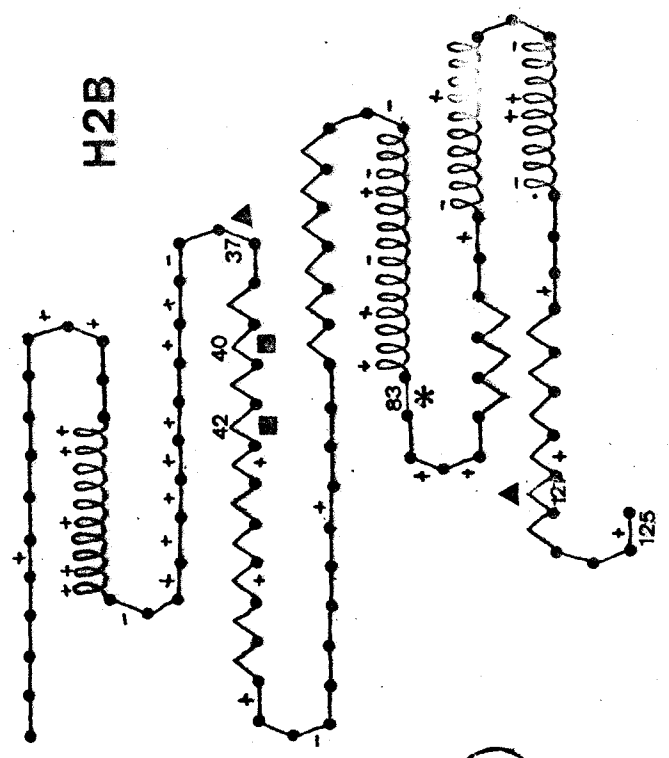
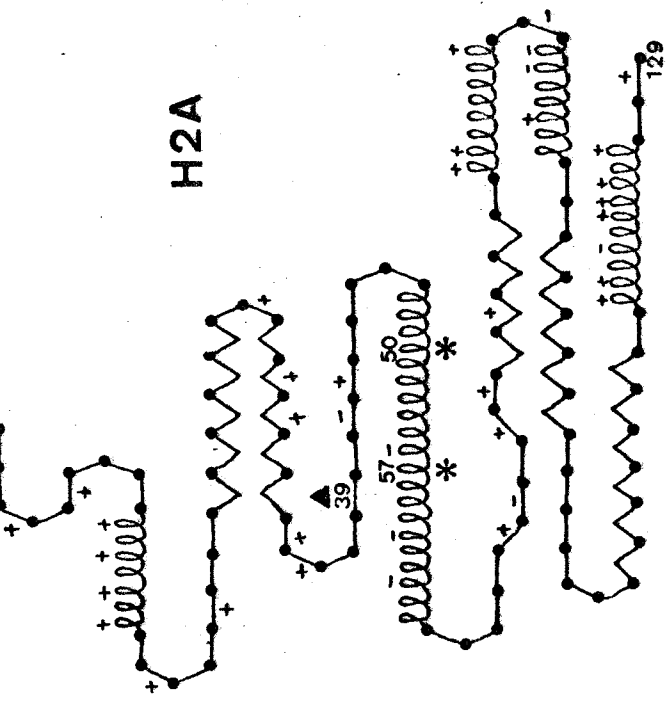
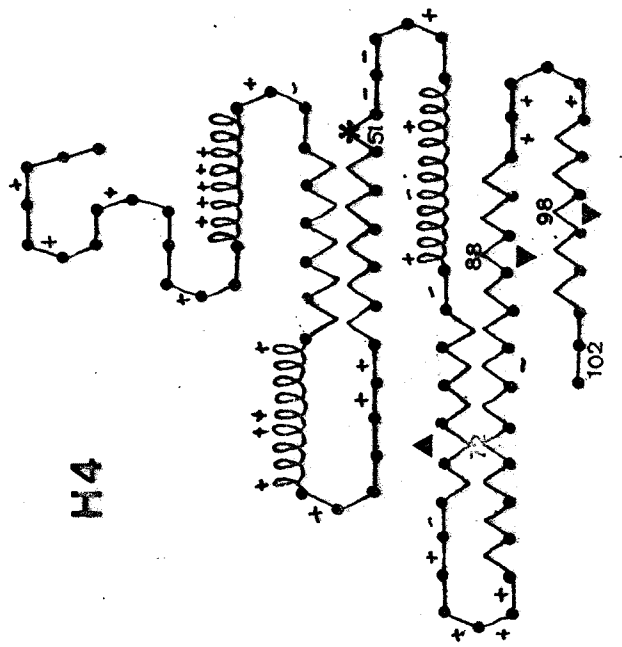
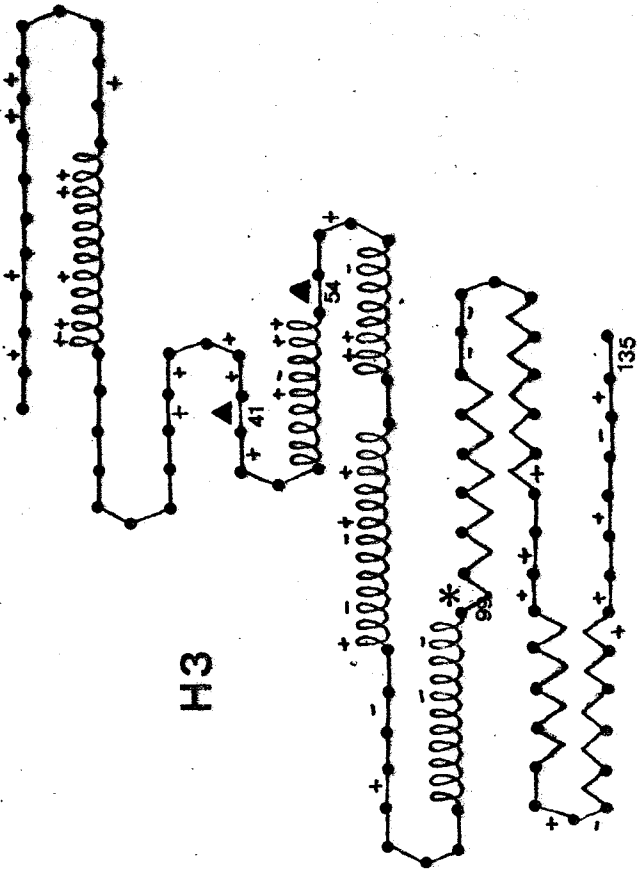
FIGURE 32



Hypothèses concernant la position des résidus tyrosine exposés







BUS LILLE

Les hypothèses que nous proposons figure 33 pourraient être vérifiées en comparant les résultats obtenus avec les histones de thymus de Veau et ceux que l'on pourrait obtenir avec des histones d'espèces différentes. En particulier, celles pour lesquelles il existe une substitution d'un résidu tyrosine. C'est le cas par exemple de l'histone H2B du sperme d'Oursin (*Parechinus angulosus*-2) (133) qui présente en position 83 une substitution tyrosine → alanine. C'est le cas également de l'histone du germe de Blé (*Triticum aestivum*-1) (voir revue 143) qui présente en position 33 une tyrosine supplémentaire par rapport à l'histone H2A du Veau (substitution leucine → tyrosine). Dans le cas de l'histone H3 du Pois (voir revue 143), c'est en position 41 une substitution tyrosine → phénylalanine. Il faut noter que cette substitution n'affecte pas la formation du dimère H2A-H2B (128). Il serait toutefois intéressant de comparer par U.V. différentiel la conformation des dimères et de l'octamère dans l'une et l'autre espèce (Pois et Veau). Il serait particulièrement intéressant de vérifier dans ce cas précis si cette substitution a un rôle au niveau des interactions qui maintiennent l'octamère puisque nous avons suggéré que cette tyrosine était impliquée dans la formation des liaisons hydrogène.

### 3 - 4 CONCLUSION

La technique de spectroscopie différentielle, dans la domaine 270-300 nm, nous a permis d'utiliser les résidus tyrosine comme sonde naturelle de la conformation des molécules. Cette technique s'est révélée adaptée à l'étude des histones et des complexes d'histones.

Les résultats obtenus sur l'octamère (H2A-H2B-H3-H4)<sub>2</sub> permettent de confirmer le modèle d'EICKBUSH et MOUDRIANAKIS selon lequel des résidus tyrosine sont impliqués dans le maintien de cet octamère.

Il serait possible de confirmer l'hypothèse concernant le rôle spécifique de chaque tyrosine ou région avoisinant ces tyrosines, en reconstituant des complexes formés d'histones provenant d'espèces différentes ; en particulier d'espèces où l'on peut noter des substitutions de résidu tyrosine.

CONCLUSION

Nous avons abordé le problème des interactions entre les histones par deux techniques différentes et complémentaires : le dichroïsme circulaire et la spectroscopie différentielle.

La méthode des variations continues appliquée au dichroïsme circulaire nous a permis de démontrer sans ambiguïté l'existence ou non d'interactions entre les deux histones H2A et H2B.

Les interactions mises en évidence par cette méthode sont les seules interactions caractérisées par une modification de la structure secondaire des molécules, en particulier par une modification de leur hélicité.

Nous avons pu montrer que l'histone H2B de testicule de Seiche présentait une certaine spécificité par rapport à son homologue de thymus de Veau. En effet, l'obtention d'un dimère H2A-H2B avec l'histone H2B de Seiche est subordonnée à la réduction préalable de cette histone. Cette réduction n'est pas nécessaire pour obtenir le dimère H2A-H2B avec l'histone H2B de Veau.

On comprend mal pourquoi l'histone H2B de Seiche, à la différence de l'histone H2B de Veau doit être réduite pour interagir avec une histone H2A. La composition en acides aminés obtenue pour l'histone H2B de Seiche est en effet voisine de celle de l'histone H2B de Veau : en particulier, ni l'une ni l'autre ne contient de cystéine et toutes deux contiennent des méthionines.

Un certain nombre d'arguments indique que la non formation du complexe pourrait être due à l'oxydation de la méthionine dans l'histone H2B de Seiche.

Si cette oxydation survient lors de la préparation, on peut se demander pourquoi elle ne se produit pas dans l'histone H2B de Veau puisque les méthodes de préparation des deux histones H2B sont semblables. L'explication que l'on peut proposer est

que les résidus de méthionine sont localisés dans un environnement différent de celui dans lequel sont placés les résidus de méthionine dans l'histone H2B de Veau.

La détermination de la séquence en acides aminés permettra de mieux définir le type de spécificité de cette histone.

En ce qui concerne la détermination de la constante d'association K des différents complexes homologues et hétérologues (l'histone H2B de Seiche étant réduite), nous ne pouvons pas donner un sens à la valeur obtenue car elle apparaît beaucoup trop imprécise.

Le dichroïsme circulaire ne permettant d'obtenir que des renseignements globaux sur la conformation de la protéine totale, nous avons utilisé la technique de spectroscopie différentielle afin d'obtenir des informations ponctuelles sur des régions bien déterminées de la molécule. Cette technique s'est révélée bien adaptée à l'étude des histones et des complexes d'histones. Elle nous a permis de déterminer dans chaque cas le nombre de résidus de tyrosine exposés.

Les résultats obtenus notamment sur l'octamère d'histones nous ont permis de confirmer le modèle d'EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (38) selon lequel les résidus tyrosine eux-mêmes sont impliqués dans le maintien de l'octamère.

Nous avons proposé un rôle spécifique pour chaque tyrosine. Ce modèle pourrait être confirmé en reconstituant des complexes à partir d'histones provenant d'espèces différentes et pour lesquelles on peut noter en particulier des substitutions de tyrosine.



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABSOLOM, D., VAN REGENMORTELM, M.H.V. (1978)  
FEBS Letters, 35, 61-64.
- 2 - ALBRIGHT, S.C., NELSON, P.P., GARRARD, W.T. (1979)  
J.Biol.Chem., 254, 1065-1073
- 3 - ALFAGEME, C.R., ZWEIDLER, A., MAHOWALD, A., COHEN, L.H. (1974)  
J.Biol.Chem., 249, 3729-3736.
- 4 - ALLFREY, V.G. (1977)  
in "Chromatin and chromosome structure" Ed.H.J.Li,  
R.A.Eckhardt, p.167 New York Academic
- 5 - ALTENBURGER, W., HÖRZ, W., ZACHAU, H. (1976)  
Nature, 264, 517-522.
- 6 - AXEL, R. CEDAR, H., FELSENFELD, G. (1975)  
Biochemistry, 14, 2489-2495.
- 7 - BAFUS, N.L., ALBRIGHT, S.C., TODD, R.D., GARRARD, W.T. (1978)  
J.Biol.Chem., 253, 2568-2574.
- 8 - BAKAYEV, V.V., BAKAYEVA, T.G., VARSHAVSKY, A.J. (1977)  
Cell, 11, 619-629.
- 9 - BALDWIN, J.P., BOSELEY, P.G., BRADBURY, E.M., IBEL, K. (1975)  
Nature, 253, 245-249.
- 10 - BELLO, J. (1976)  
Int.J.Peptide protein Res., 8, 393-415.
- 11 - BÖHM, L., HAYASHI, H., CARY, P.D., MOSS, T., CRANE ROBINSON, C.,  
BRADBURY, E.M. (1977)  
Eur.J.Biochem., 77, 487-493.
- 12 - BONNER, W.M. (1978)  
Nucleic Acids Res., 5, 71-86.
- 13 - BONNER, W.M., POLLARD, H.B. (1975)  
Biochem.Biophys.Res.Comm., 64, 282-288.
- 14 - BOULIKAS, T., WISEMAN, J.M., GARRARD, W.T. (1980)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 77, 127-131.
- 15 - BUSCH, H., BALLAL, N.R., BUSCH, R.K., CHOI, Y.C., DAVIS, F.,  
GOLDKNOPF, I.L., MATSUI, S.I., RAO, M.S., ROTHBLUM, L.I. (1978)  
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 42, 665-683.



- 16 - BUTLER, A.P., HARRINGTON, R.E., OLINS, D.E. (1979)  
Nucleic Acids Res., 6, 1509-1520.
- 17 - CAMPBELL, A.M., COTTER, R.I. (1976)  
FEBS Letters, 70, 209-211.
- 18 - CARY, P.D., MOSS, T., BRADBURY, E.M. (1978)  
Eur.J.Biochem., 89, 475-482.
- 19 - CHAN, D.C.F., PIETTE, L.H. (1980)  
Biochim.Biophys.Acta, 623, 32-45.
- 20 - CHOU, P.Y., FASMAN, G.D. (1978)  
Ann.Rev.Biochem., 47, 251-276.
- 21 - CHUNG, S.Y., HILL, W.E., DOTY, P. (1978)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 75, 1680-1684.
- 22 - COTTER, R.I., LILLEY, D.M.J. (1977)  
FEBS Letters, 82, 63-68.
- 23 - COUPPEZ, M., MICHALSKI-SCRIVE, C., SAUTIERE, P., BISERTE, G.  
Manuscrit en préparation
- 24 - CREMISI, C. (1979)  
Microbiol.Revs., 297-319.
- 25 - CREPIN, M., DASTUGUE, B. (1979)  
Eur.J.Biochem., 29, 499-505.
- 26 - D'ANNA, J.A., ISENBERG, I. (1973)  
Biochemistry, 12, 1035-1043.
- 27 - D'ANNA, J.A., ISENBERG, I. (1974)  
Biochemistry, 13, 4992-4997.
- 28 - DAVIES, H.G. (1968)  
J.Cell.Sci, 3, 129-150.
- 29 - DEFER, N., DASTUGUE, B., KRUEH, J. (1975)  
Biochimie, 56, 1549-1557.
- 30 - DEFER, N., KITZIS, A., KRUEH, J., BRAHMS, S., BRAHMS, I. (1977)  
Nucleic Acids.Res., 4, 2293-2306.
- 31 - DELANGE, R.J., WILLIAMS, L.C., MARTINSON, H.G. (1979)  
Biochemistry, 18, 1942-1946.
- 32 - DE MURCIA, G., MAZEN, A., ERARD, M., POJYET, J., CHAMPAGNE, M.  
(1980)  
Nucleic Acids Res., 8, 767-779.



- 33 - De PAMPHILIS, M.L., WASSARMAN, P.M. (1980)  
Ann.Rev.Biochem., 49, 627-666.
- 34 - DIXON, G.H., CANDIDO, E.P.M., HONDA, B.M., LOUIE, A.J.  
Mac LEOD, A.R., SUNG, M.T. (1975)  
in "The Structure and function of chromatin" Presented  
at Ciba Found.Symp. 28, London, pp.229-258.
- 35 - DOUVAS, A.S., HARRINGTON, C.A., BONNER, J. (1975)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 72, 3902-3906.
- 36 - EASTON, D., CHALKLEY, R. (1972)  
Exp.Cell.Res., 72, 502-506.
- 37 - EDELHOCH, H. (1967)  
Biochemistry, 6, 1948-1954.
- 38 - EICKBUSH, T.H., MOUDRIANAKIS, E.N. (1978)  
Biochemistry, 17, 4955-4964.
- 39 - ELGIN, S.C.R., BONNER, J. (1973)  
in "The Biochemistry of gene expression in higher  
organisms. J.K.Pollak and J.W. Lee, eds, pp 142-163.
- 40 - ELGIN, S.C.R., SCHILLING, J., HOOD, L.E. (1979)  
Biochemistry, 18, 5679-5685.
- 41 - FASMAN, G.D., CHOU, P.Y., ADLER, A.J. (1977)  
The Mol.Biol.of Mammalian Gen.App., ed.by P.TS'0  
ch.1, 1-52.
- 42 - FINCH, J.T., KLUG, A. (1976)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 73, 1897-1901.
- 43 - FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUCHTON, B.  
LEVITT, M., KLUG, A. (1977)  
Nature, 269, 29-36.
- 44 - FOE, V.E., WILKINSON, L.E., LAIRD, C.D. (1976)  
Cell, 9, 131-146.
- 45 - GAREL, A., AXEL, R. (1976)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 73, 3966-3970.
- 46 - GERSHEY, E.L., HASLETT, G.W., VIDALI, G., ALLFREY, V.G. (1969)  
J.Biol.Chem., 244, 4871-4877.
- 47 - GLOTOV, B.O., ITKES, A.V., NIKOLAEV, L.G., SEVERIN, E.S. (1978)  
FEBS Letters, 91, 149-152.
- 48 - GLOVER, C.V.C., GOROVSKY, M.A. (1978)  
Biochemistry, 17, 5705-5713.



- 49 - GLOVER, C.V.C., GOROVSKY, M.A. (1979)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 76, 585-589.
- 50 - GODFREY, J.E., EICKBUSH, T.H., MOUDRIANAKIS, E.N. (1980)  
Biochemistry, 19, 1339-1346.
- 51 - GOLDKNOPF, I.L., FRENCH, M.F., MUSSO, R., BUSCH, H. (1977)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 74, 5492-5495.
- 52 - GOODWIN, G.H., SANDERS, C., JOHNS, E.W. (1973)  
Eur.J.Biochem., 38, 14-19.
- 53 - GORDON, V.C., SHUMAKER, V.V., OLINS, D.E., KNOBLER, C.M.,  
HORWITZ, J. (1979)  
Nucleic Acids Res., 6, 3845-3858.
- 54 - GOTTESFELD, J.M., BAGI, G., BERG, B., BONNER, J. (1976)  
Biochemistry, 15, 2472-2483.
- 55 - GRELLET, F., DELSENEY, M., GUITTON, Y. (1977)  
Nature, 267, 724-726.
- 56 - HARDISON, R.C., ZEITLER, J.P., MURPHY, J.H., CHALKLEY, R. (1977)  
Cell, 12, 417-427.
- 57 - HAYASHI, O., UEDA, K. (1977)  
Ann.Rev.Biochem., 46, 95
- 58 - HEWISCH, D.R., BURGOYNE, L.A. (1973)  
Biochem.Biophys.Res.Comm., 52, 504-510.
- 59 - HUNT, L.T., DAYHOFF, M.O. (1977)  
Biochem.Biophys.Res.Comm., 74, 650-655.
- 60 - ISENBERG, I. (1979)  
Ann.Rev.Biochem., 48, 159-191.
- 61 - JACKSON, V. (1978)  
Cell, 15, 945-954.
- 62 - JOHNS, E.W. (1967)  
Biochem.J., 105, 611-614.
- 63 - JOHNS, E.W. (1977)  
Methods in Cell Biology, vol.XVI, 183-203.
- 64 - JORCANO, J.L., RUIZ-CARILLO, A. (1979)  
Biochemistry, 18, 768-774.
- 65 - KELLEY, R.I. (1973)  
Biochem.Biophys.Res.Comm., 54, 1588-1594.



- 66 - KORNBERG, R.D. (1974)  
Science, 184, 868-871.
- 67 - KORNBERG, R.D., THOMAS, J.D. (1974)  
Science, 184, 865-868.
- 68 - KRUIH, J., TICHONICKY, L. (1976)  
Eur. J. Biochem., 62, 109-115.
- 69 - LACY, E., AXEL, R. (1975)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3978-3982.
- 70 - LANCELOT, G., HELENE, C. (1977)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 4872-4875.
- 71 - LANGMORE, J.P., WOOLEY, J.C. (1975)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 2691-2695.
- 72 - LASKEY, R.A., HONDA, B.M., MILLS, A.D., FINCH, J.T. (1978)  
Nature, 275, 416-420.
- 73 - LEFFAK I.M., GRAINGER, R., WEINTRAUB, H. (1977)  
Cell, 12, 837-845.
- 74 - LEVY-WILSON, B., DIXON, G.H. (1979)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 1682-1686.
- 75 - LEWIS, E.N., BRADBURY, E.M., CRANE-ROBINSON, C. (1975)  
Biochemistry, 14, 3391
- 76 - LILLEY D.M.J., PARDON, J.F., RICHARDS, B.M. (1977)  
Biochemistry, 16, 2853-2860.
- 77 - LILLEY, D.M.J., TATCHELL, K. (1977)  
Nucleic Acids Res., 4, 2039-2055.
- 78 - LUTTER, L.C. (1978)  
J. Mol. Biol., 124, 391-420.
- 79 - LUZZATI, V., NICOLAIEFF, A. (1963)  
J. Mol. Biol., 7, 142-163.
- 80 - Mc KNIGHT, S.L., BUSTIN, M., MILLER, O.L. Jr (1977)  
Cold Spring Harbor Quant. Biol., 2, 741-754.
- 81 - Mc KNIGHT, S.L., MILLER, O.L. Jr (1976)  
Cell, 8, 305-319.
- 82 - MARDIAN, J.K.W., ISENBERG, I. (1978)  
Biochemistry, 17, 3825-3833.
- 83 - MARTINSON, H.G., Mc CARTHY, B.J. (1975)  
Biochemistry, 14, 1073-1078.



- 84 - MARTINSON, H.G., Mc CARTHY, B.J. (1976)  
Biochemistry, 15, 4126-4131.
- 85 - MARTINSON, H.G., TRUE, R., LAU, C.K., MEHRABIAN, M. (1979)  
Biochemistry, 18, 1075-1082.
- 86 - MAYER, R., TOULME, F., MONTENAY-GARESTIER, T., HELENE, C. (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 75-82.
- 87 - MOSS, T., CARY, P.D., ABERCROMBIE, B.D., CRANE-ROBINSON, C.  
BRADBURY, E.M. (1976)  
Eur. J. Biochem., 71, 337-350.
- 88 - MOSS, T., CARY, P.D., CRANE-ROBINSON, C., BRADBURY, E.M. (1976)  
Biochemistry, 15, 2261-2267.
- 89 - NEELIN, J.M., MAZEN, A., CHAMPAGNE, M. (1976)  
FEBS Letters, 65, 309-314.
- 90 - NELSON, P.P., ALBRIGHT, S.C., GARRARD, W.T. (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 9194-9199.
- 91 - NEWROCK, K.M., ALFAGEME, C.R., NARDI, R.V., COHEN, L.H. (1978)  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 421-431.
- 92 - NICOLA, N.A., FULMER, A.W., SHWARTZ, A.M., FASMAN, G.D. (1978)  
Biochemistry, 17, 1779-1785.
- 93 - NICOLA, N.A., LEACH, S.J. (1976)  
Int. J. Peptide Protein Res., 8, 393-415.
- 94 - NOLL, M. (1974)  
Nature, 251, 249-251.
- 95 - NOLL, M. (1974)  
Nucleic Acids Res., 1, 1573-1578.
- 96 - OLINS, D.E. (1979)  
in "Chromatin structure and function" Ed. C.A. Nicolini  
pp. 109-135 New York Plenum.
- 97 - OLINS, D.E., BRYAN, P.N., HARRINGTON, R.E., HILL, W., OLINS, A.L.  
(1977)  
Nucleic Ac. Res., 4, 1911-1931.
- 98 - OLINS, A.L., CARLSON, R.D., WRIGHT, E.B., OLINS, D.E. (1976)  
Nucleic Ac. Res., 3, 3271-3291.
- 99 - OLINS, A.L., OLINS, D.E. (1974)  
Science, 183, 330
- 100 - OUDET, P., GROSS-BELLARD, M., CHAMBON, P. (1975)  
Cell, 4, 281-300.



- 101 - OUDET, P., SPADAFORA, C., CHAMBON, P. (1977)  
Cold Spring Harbor Quant. Biol., 42, 301-312.
- 102 - PALAU, J., PADROS, E. (1975)  
Eur. J. Biochem., 52, 555-560.
- 103 - PANYIM, S., CHALKLEY, R. (1969)  
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346.
- 104 - PARDON, J.F., WILKINS, M.H.F. (1972)  
J. Mol. Biol., 68, 115-124.
- 105 - PARDON, J.F., WORCESTER, D.L., WOOLEY, J.C., COTTER, R.I.,  
LILLEY, D.M.J., RICHARDS, B.M. (1977)  
Nucleic Acids Res., 21, 3199-3214.
- 106 - PARDON, J.F., WORCESTER, D.L., WOOLEY, J.C., TATCHELL, K.,  
VAN HOLDE, K.E., RICHARDS, B.M. (1975)  
Nucleic Acids Res., 2, 2163-2176.
- 107 - PRUNELL, A., KORNBERG, R.D. (1977)  
Cold Spring Harbor Quant. Biol., 42, 103-108.
- 108 - REEVES, R. (1977)  
Eur. J. Biochem., 75, 545-560.
- 109 - REEVES, R., JONES, A. (1976)  
Nature, 260, 495-500.
- 110 - RENZ, M., NEHLS, P., HOZIER, J. (1977)  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 1879-1883.
- 111 - REUDELHUBER, T.L., BOULIKAS, T., GARRARD, W.T. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 4511-4515.
- 112 - RILL, R., VAN HOLDE, K.E. (1973)  
J. Biol. Chem., 248, 1080-1085.
- 113 - ROARK, D.E., GEOGHEGAN, T.E., KELLER, G.H. (1974)  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 542-547.
- 114 - RUIZ-CARILLO, A., JORCANO, J.L. (1979)  
Biochemistry, 18, 760-768.
- 115 - SAHASRABUDDHE, C.G., VAN HOLDE, K.E. (1974)  
J. Biol. Chem., 249, 152-156.
- 116 - SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., RUFFIN, P.,  
BISERTE, G. (1974)  
Eur. J. Biochem., 41, 563-576.
- 117 - SCHAEPPPI, Y. TREADWELL, W.D. (1948)  
Helv. Chim. Acta, 31, 577-588.



- 118 - SCHEER, U. (1978)  
Cell, 13, 535-549.
- 119 - SHIRES, A., CARPENTER, M.P. (1976)  
J. Biol. Chem., 251, 4155-4158.
- 120 - SIMON, R.H., CAMERINI-OTERO, R.D., FELSENFELD, G. (1978)  
Nucleic Acids Res., 5, 4805-4818.
- 121 - SIMPSON, R.T., WHITLOCK, J.P. Jr (1976)  
Cell, 9, 347-353.
- 122 - SKANDRANI, E., MIZON, J., SAUTIERE, P., BISERTE, G. (1972)  
Biochimie, 54, 1267-1272.
- 123 - SMERDON, M.J., ISENBERG, I. (1976)  
Biochemistry, 15, 4242-4247.
- 124 - SOLLNER-WEBB, B., FELSENFELD, E. (1975)  
Biochemistry, 14, 2915-2920.
- 125 - SPADAFORA, C., OUDET, P., CHAMBON, P. (1979)  
Eur. J. Biochem., 100, 225-235.
- 126 - SPELSBERG, T.C., HNILICA, L.S.  
Biochim. Biophys. Acta, 228, 202-211.
- 127 - SPERLING, R., BUSTIN, M. (1975)  
Biochemistry, 14, 3322-3331.
- 128 - SPIKER, S., ISENBERG, I. (1977)  
Biochemistry, 16, 1819-1826.
- 129 - SPIKER, S., ISENBERG, I. (1977)  
Cold Spring Harbor Quant. Biol., 1, 157-163.
- 130 - STAYNOV, D.Z., SPENCER, M., ALLAN, J., GOULD, H.J. (1979)  
Nature, 279, 263-265.
- 131 - STEINMETZ, M., STREECK, R.E., ZACHAU, H.G. (1978)  
Eur. J. Biochem., 83, 615-628.
- 132 - STRICKLAND, M., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F., VON HOLT, C.  
(1977)  
Eur. J. Biochem., 77, 263-286.
- 133 - STRICKLAND, M., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.E., VON HOLT, C.,  
LEHMANN, A., WITTMANN-LIEBOLD, B. (1978)  
Eur. J. Biochem., 89, 443-452.
- 134 - TANCREDI, T., TEMUSSI, P.A., PAOLILLO, L., TRIVELLOME, E.,  
CRANE-ROBINSON, C., BRADBURY, E.M. (1976)  
Eur. J. Biochem., 70, 403-408.



- 135 - THOMA, F., KOLLER, T.H., KLUG, A. (1979)  
J.Cell.Biol., 83, 403-427.
- 136 - THOMAS, G., LANGE, H.W., HEMPEL, K. (1975)  
Eur.J.Biochem., 51, 609-615.
- 137 - THOMAS, G.J., PRESCOTT, B., OLINS, D.E. (1977)  
Science, 197, 385-388.
- 138 - THOMAS, J.O., BUTLER, P.J.G. (1977)  
J.Mol.Biol., 116, 769-781.
- 139 - THOMAS, J.O., KORNBERG, R.D. (1975)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 72, 2626-2630.
- 140 - TIEN KUO, M., SAHASRABUDDHE, C.G., SAUNDERS, G.F. (1976)  
Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 73, 1572-1575.
- 141 - TODD, R.D., GARRARD, W.T. (1979)  
J.Biol.Chem., 254, 3074-3083.
- 142 - VAN HELDEN, P.D. (1980)  
Biochim.Biophys.Acta, 623, 429-438.
- 143 - VON HOLT, C., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F., STRICKLAND, M.S.  
(1979)  
FEBS Letters, 100, 201-218.
- 144 - VOORDOUW, G., EISENBERG, H. (1978)  
Nature, 273, 446-448.
- 145 - VOSBURGH, W.C., COOPER, G.R. (1941)  
J.Amer.Chem.Soc., 63, 437-442.
- 146 - WALLACE, R.B., DUBE, S.K., BONNER, J. (1977)  
Science, 198, 1166-1168.
- 147 - WEINTRAUB, H., FLINT, S.J., LEFFAK, I.M., GROUDINE, M.,  
GRAINGER, R.M. (1978)  
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. ,42, 401-407.
- 148 - WEINTRAUB, H., GROUDINE, M. (1976)  
Science, 193, 848-856.
- 149 - WEINTRAUB, H., PALTER, K., VAN LENTE, F. (1975)  
Cell, 6, 85-110.
- 150 - WEINTRAUB, H., WORCEL, A., ALBERTS, B. (1976)  
Cell, 9, 409-417.
- 151 - WILHELM, F.X., DE MURCIA, G.H., CHAMPAGNE, M., DAUNE, M. (1974)  
Eur.J.Biochem., 45, 431-443.



- 152 - WHITLOCK, J.P. Jr (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 5684-5689.
- 153 - WHITLOCK, J.P. Jr, SIMPSON, R.T. (1976)  
Biochemistry, 15, 3307-3314.
- 154 - WILKINS, M.H.F. (1956)  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 21, 75
- 155 - WOODCOCK, C.L.F. (1973)  
J. Cell. Biol., 59, 368
- 156 - WORCEL, A., HAN, S., WONG, M.L. (1978)  
Cell, 15, 969-977.
- 157 - WOUTERS-TYROU, D. (1977)  
Thèse Doctorat d'Etat, Lille I
- 158 - YU, S.S., LI, H.J., GOODWIN, G.H., JOHNS, E.W. (1977)  
Eur. J. Biochem., 78, 497-502.
- 159 - YU, S.H., SPRING, T.G. (1977)  
Biochim. Biophys. Acta, 492, 20-28.
- 160 - ZAMA, M., BRYAN, P.N., HARRINGTON, R.E., OLINS, A.L., OLINS, D.E.  
(1977)  
Cold Spring Harbor Quant. Biol., 42, 31-41.
- 161 - ZUBAY, G. (1964)  
in "The Nucleohistones" , Bonner and TS'O, Holden-day



APPENDICE TECHNIQUE

## TECHNIQUES DE PREPARATION DES HISTONES ET DES COMPLEXES D'HISTONES

1 - <u>Extraction de la chromatine à partir du tissu</u>	1
2 - <u>Mise en solution de la fraction F2a2 pour l'isolement des histones H2A et H2B</u>	1
3 - <u>Techniques de chromatographie</u>	1
3 - 1 Filtration sur colonne de Biogel P 10	1
3 - 2 Filtration sur colonne de Sephadex G-100	2
3 - 2-1 en milieu acétate de sodium 50 mM, pH 5,1	2
3 - 2-2 en milieu chlorure de sodium 2M, pH 7,5	2
3 - 3 Echange ionique sur colonne de Biorex 70	3

### METHODES ANALYTIQUES

1 - <u>Electrophorèse en gel de polyacrylamide</u>	4
2 - <u>Analyse en acides aminés</u>	4
3 - <u>Carte peptidique : hydrolyse par la trypsine</u>	4

### TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

1 - <u>Absorption ultra-violette</u>	6
1 - 1 Dosage des histones à 174,5 nm	6
1 - 2 Origine des spectres de différence obtenus par perturbation thermique	7
2 - <u>Dichroïsme circulaire</u>	8

## TECHNIQUES DE PREPARATION DES HISTONES ET DES COMPLEXES D'HISTONES

1 - EXTRACTION DE LA CHROMATINE A PARTIR DU TISSU

La chromatine a été extraite des tissus selon la méthode de STRICKLAND \* . Toutes les manipulations sont effectuées à 4°C. 250 gr de tissu sont homogénéisés à l'aide d'un Waring Blendor dans 1,5 l d'une solution de NaCl 0,14M, citrate de sodium 0,01M, diisopropylfluorophosphate (DFP) 0,1 mM, pH 7,1. L'homogénat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze et centrifugé à 1100 g dans la même solution saline puis finalement 2 fois dans l'éthanol à 80 p.100

2 - MISE EN SOLUTION DE LA FRACTION F2a2 POUR L'ISOLEMENT DES HISTONES H2A ET H2B

1,2 g de la fraction F2a2 sont dissous dans HCl  $10^{-2}$ M à la concentration de 40 mg/ml. A la solution de protéines, on ajoute de l'éthanol et de l'HCl pour obtenir une concentration finale en éthanol de 80 p.100, une concentration en HCl de 0,25M et une concentration en protéines de 4 mg/ml. La solution est laissée 15 heures à 4°C puis centrifugée 1 heure à 3000 g.

3 - TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE3 - 1 Filtration sur colonne de Biogel P 10

100 à 140 mg de protéines sont dissous dans 6 ml de tampon Tris 0,1M, GuCl 6M, 2-mercaptoéthanol 5 p.100. La solution est laissée une nuit à température ambiante puis clarifiée par centrifugation avant d'être déposée sur la colonne de Biogel P 10 (150 x 5 cm).

\* STRICKLAND W.N., SHALLER H., STRICKLAND M., VON HOLT C. (1976) FEBS Letters, 66, 322-327.

La colonne est équilibrée et éluée par  $\text{HCl } 10^{-2}\text{M}$ , saturé en chloroforme. Le débit de la colonne est de 70 ml/h et les fractions recueillies de 18 ml.

Le repérage des protéines est effectué par mesure de la densité optique à 230 nm.

### 3 - 2 Filtration sur colonne de Sephadex G-100

#### 3 - 2-1 en milieu acétate de sodium 50 mM, pH 5,1

25 à 30 mg de protéines sont dissous dans 1,5 ml de tampon Tris 0,1M,  $\text{GuCl } 6\text{M}$ , 2-mercaptoéthanol 5 p.100 pH 8,2. La solution est ensuite traitée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

La colonne de Sephadex G-100 (200 x 1,5 cm) est équilibrée et éluée par un tampon acétate de sodium 50 mM, bisulfite de sodium 5 mM, pH 5,1. Le débit de la colonne est de 15 ml/h et les fractions recueillies de 7,5 ml.

Le repérage des protéines est effectué par mesure de la densité optique de l'éluat à 230 nm.

#### 3 - 2-2 en milieu chlorure de sodium 2M pH 7,5

Cette technique nous a permis de préparer l'octamère d'histones.

12 mg d'histones totales dont H1 a été éliminée par traitement à l'acide perchlorique à 5 p.100 sont dissous dans 2 ml de  $\text{GuCl } 2\text{M}$ ,  $\text{HCl } 10^{-2}\text{M}$ , 2-mercaptoéthanol 5 p.100, pH 6,8. Après une nuit à température ambiante, la solution de protéine est dialysée 36 heures sous azote contre un tampon Tris 0,01M, pH 7,5 contenant  $\text{NaCl } 2\text{M}$  et du 2-mercaptoéthanol 1 p.100. Après centrifugation, la solution est déposée sur colonne de Sephadex G-100 (90 x 1,6 cm) équilibrée et éluée par le tampon Tris 0,01M pH 7,5 contenant  $\text{NaCl } 2\text{M}$ .

Des fractions de 1,3 ml sont collectées à un débit de 8 ml/h. La densité optique de l'éluat est mesurée à 230 nm.

### 3 - 3 Echange ionique sur colonne de Biorex 70

500 mg de protéine sont dissous dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, GuCl 40 p.100 à la concentration de 10 mg/ml.

La solution est laissée une nuit à température ambiante puis dialysée contre un volume calculé de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 afin d'ajuster la solution de protéines à une concentration finale en GuCl correspondant à celle du tampon d'équilibration de la colonne. La solution est déposée sur une colonne de Biorex 70 (100 x 2,5 cm) équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 6,8 contenant le GuCl à 7 p.100, 7,5 p.100 ou 8 p.100 selon les types de préparation. La colonne est éluée par un gradient linéaire de GuCl de 7 p.100 à 12 p.100 pour l'isolement de l'histone H2B et du complexe H2A-H2B, de 7,5 p.100 à 12,5 p.100 pour l'isolement de l'histone H2A ou de 8 p.100 à 13 p.100 pour la préparation du complexe H3-H4. Le débit de la colonne est de 20 ml/h et les fractions recueillies de 13,3 ml.

L'éluution des protéines est suivie par turbidimétrie. 150 µl d'éluat sont prélevés dans chaque tube, additionnés de 1,05 ml d'eau distillée et de 0,6 ml d'acide trichloracétique (ATCA) 3,3M. La mesure de la densité optique s'effectue 15 minutes après addition de l'ATCA. La concentration en GuCl dans l'éluat est mesurée par réfractométrie.

Pour la préparation des complexes (H3-H4)<sub>2</sub>, toutes les manipulations sont effectuées en présence de 1 p.100 de 2-mercaptoéthanol.

## METHODES ANALYTIQUES

1 - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les électrophorèses sont réalisées sur des plaques de gel de polyacrylamide selon la méthode décrite par J.P. KERCKAERT \* Elles sont effectuées dans le système PANYIM et CHALKLEY, en milieu acide acétique 0,9 M et en présence d'urée 2,5M ou 6,25M (103) mais pour une concentration en acrylamide de 17 p.100.

Les échantillons de protéines sont dissous dans une solution : HCl 0,01 M, urée 8M, 2-mercaptoéthanol 1 p.100, à une concentration de 1 mg/ml.

La migration s'effectue à 22 mA pendant 3 heures. Le gel est ensuite coloré pendant 30 minutes dans une solution de Bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R 250) à 0,3 p.100 dans le mélange : éthanol/acide acétique/eau (20:7:73, v/v), puis décoloré dans le même mélange solvant.

2 - ANALYSE EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés des histones est déterminée après hydrolyse par l'HCl 6M, à 110°C, pendant 2 h et 72 h, en tubes scellés sous vide. L'addition d'une goutte de phénol à 1 p.100 permet d'éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

L'analyse des acides aminés est effectuée sur un analyseur Beckman, type Multichrom A, équipé d'un intégrateur Infotronics CRS 210.

3 - CARTE PEPTIDIQUE : HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE

3 mg d'histone H2B sont hydrolysés par la trypsine pendant 2 heures à 37°C, dans un tampon N-méthylmorpholine 0,1 M, pH 8,0.

---

\* KERCKAERT J.P. (1978) Anal.Biochem., 84, 354-360

Le rapport  $\frac{\text{enzyme}}{\text{substrat}}$  est de 1/50. L'hydrolyse est arrêtée en amenant le pH à 3,5 par addition d'acide formique pur.

L'hydrolysate est évaporé à sec et repris dans 0,3 ml d'acide acétique à 10 p.100. Une aliquote de 0,1 ml est déposée sur une feuille de papier Whatman 3 MM préalablement lavée pendant 48 heures avec de l'acide acétique à 10 p.100.

Les peptides sont séparés par chromatographie descendante dans le système solvant : butanol-1/pyridine/acide acétique/eau (15:10:3:12, v/v/v/v) pendant 18 heures, suivie d'une électrophorèse à 2500 volts pendant 75 minutes dans le tampon pyridine/acide acétique/eau (1:10:289, v/v/v) de pH 3,6. L'appareil utilisé pour l'électrophorèse est un Electrophorator GILSON modèle D.

Après séchage par simple ventilation, les cartes peptidiques sont placées 1 heure à 100°C en étuve. Les peptides sont révélés avec le réactif ninhydrine/cadmium:

ninhydrine	10 g
acétone	1000 ml
acétate de cadmium	1 g
acide acétique	50 ml
eau	100 ml

Les peptides contenant de l'arginine sont révélés spécifiquement avec le réactif à la phénanthrène quinone, constitué de volumes égaux des solutions A et B :

Solution A :	phénanthrène quinone	0,02 g
	éthanol	100 ml
Solution B :	NaOH	10 g
	éthanol 60 p.100	qsp
		100 ml

Sous lumière ultra-violette, à 366 nm, les peptides renfermant de l'arginine donnent une fluorescence bleue.

## TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

1 - ABSORPTION ULTRA-VIOLETTE1 - 1 Dosage des histones à 274,5 nm

L'absorbance A ou densité optique est reliée à la concentration par la relation :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot \frac{C}{M}$$

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire en  $\text{mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{litre}$

l : épaisseur de la cellule en cm

c : concentration de soluté en mg/ml

M : masse moléculaire en g

La concentration des histones est déterminée à 274,5 nm en prenant  $\epsilon_{\text{NAC-Tyr-OEt}} = 1340 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{litre} *$

Les valeurs des coefficients d'extinction molaire ainsi que les valeurs des masses moléculaires de chacune des histones étudiées sont reportées dans le tableau ci-dessous :

	H2A Veau	H2B Veau	H2A Seiche	H2B Seiche	H3 Veau	H4 Veau
$\epsilon_{274,5\text{nm}}$	4.020	6.700	4.020	6.700	4.020	5.360
M	14.000	13.770	13.240	13.310	15.300	11.300

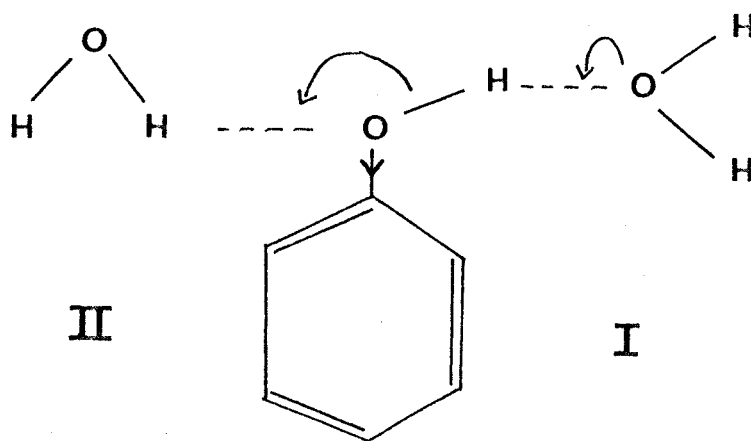
\* HERSKOVITS, SORENSEN (1968) Biochemistry, 7, 2523-2542.



## 1 - 2 Origine des spectres de différence obtenus par perturbation thermique

En augmentant l'énergie cinétique des molécules, l'augmentation de la température provoque un élargissement de la bande d'absorption des chromophores. En augmentant la densité du solvant et les interactions solvant-soluté, elle provoque en outre un déplacement du maximum d'absorption vers le bleu.

Dans le cas des résidus de tyrosine en solution aqueuse, l'augmentation de la température entraîne l'élargissement normal et attendu de la bande d'absorption du chromophore ainsi que le déplacement de son maximum. En solution aqueuse, ce déplacement s'effectue toutefois vers le rouge alors que c'est un déplacement vers le bleu qui est attendu. Selon NICOLA et LEACH (93), le déplacement anormal du maximum d'absorption vers le rouge en fonction de la température pour les tyrosines en solution aqueuse est dû au comportement bifonctionnel des groupements hydroxyl des molécules vis-à-vis de l'eau. Ces groupements hydroxyl se comportent en effet à la fois comme donneurs de protons (liaison hydrogène de type I) et accepteurs de protons (liaison hydrogène de type II)



Alors que le premier type de liaison provoque un déplacement du maximum d'absorption vers le rouge, le deuxième type de liaison provoque un déplacement égal de ce maximum vers le bleu. Lorsque la température augmente, les liaisons hydrogène de type II sont préférentiellement détruites. En effet, si la formation des liaisons hydrogène de type I facilite la formation des liaisons hydrogène de type II en enrichissant en électrons l'oxygène du phénol, l'effet inductif du noyau benzénique qui déplace vers lui les charges négatives de ce même oxygène, tend au contraire à affaiblir les liaisons de type II. Celles-ci plus faibles, sont détruites préférentiellement lorsque la température augmente. Il en résulte un déplacement net du maximum d'absorption vers le rouge.

Ce phénomène n'est observé qu'en solution aqueuse. Remises dans un solvant non polaire, les molécules de tyrosine se comportent de façon classique et le déplacement du maximum d'absorption du chromophore s'effectue à nouveau normalement vers le bleu.

## 2 - DICHRÖISME CIRCULAIRE

Toute molécule qui absorbe la lumière et possède une activité optique (due à l'absence de centre  $\sigma$  de plan de symétrie) peut faire l'objet d'une étude par dichroïsme circulaire.

Les protéines remplissent ces conditions :

- elles absorbent la lumière vers 200 nm au niveau de la liaison peptidique et vers 280 nm au niveau des résidus aromatiques.

- elles possèdent une activité optique puisqu'elles sont asymétriques. Le carbone  $\alpha$  ( $C_\alpha$ ) de chaque résidu d'acide aminé (sauf la glycine), les structures secondaires ou tertiaires qu'elles adoptent, ôtent aux molécules tout centre ou plan de symétrie.

Les substances optiquement actives, absorbent différemment les lumières circulairement polarisées droite et gauche. La différence entre les deux absorptions en fonction de la longueur d'onde donne le spectre d'absorption dichroïque.

L'activité optique est extrêmement sensible aux changements de conformation. On peut ainsi obtenir des informations sur les variations de conformation des molécules :

- au niveau des résidus aromatiques : dans le domaine spectral 350 nm - 250 nm (domaine extrinsèque)

- au niveau des liaisons peptidiques : dans le domaine spectral 250 nm - 180 nm (domaine intrinsèque)

Dans le domaine extrinsèque, les informations recueillies concernent l'environnement des résidus aromatiques et donc la structure tertiaire alors que dans le domaine intrinsèque, on obtient des informations sur la structure secondaire de la molécule. Chaque type de structure secondaire est en effet ressenti par la liaison peptidique de façon différente et fournit un signal dichroïque bien caractéristique. Des études réalisées sur des polypeptides et des protéines dont les structures secondaires sont parfaitement connues ont permis d'obtenir des spectres dichroïques de référence correspondant à 100 p.100 d'une structure secondaire donnée ; hélicoïdale, en feuillet plissé  $-\beta$  ou inordonnée (random coil) (Figure 34).

Il faut signaler qu'une structure 100 p.100 feuillet plissé  $-\beta$  ne fournit qu'un faible signal dichroïque. C'est pourquoi la technique de dichroïsme circulaire est peu adaptée à la mise en évidence de cette structure. On lui préfère dans pareil cas, les techniques de spectroscopie infrarouge ou raman. Elle est par contre particulièrement sensible à la présence des structures hélicoïdales et fournit d'excellents renseignements à leur niveau.

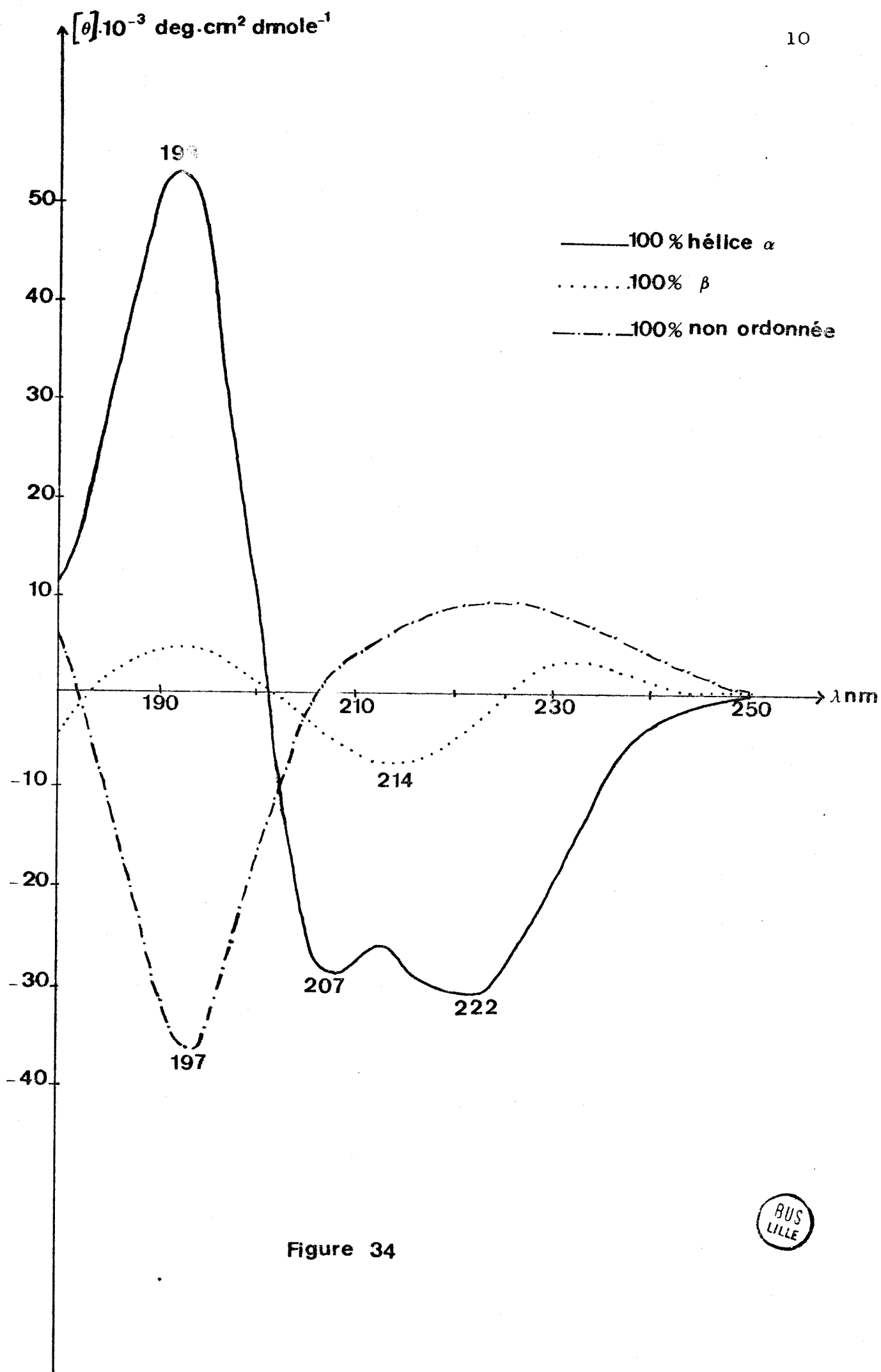


Figure 34



A une longueur donnée, on exprime:

- l'ellipticité molaire  $\{\theta\}$  en degré  $\text{cm}^2/\text{dmole}$  de résidu selon la relation 1 :

$$\{\theta\} = 3300 \Delta\epsilon = 3300 \frac{m}{c \times d} s \cdot \Delta$$

- La différence des coefficients d'absorption  $\Delta\epsilon$  en  $\text{cm}^{-1}$  l. par mole de protéine selon la relation 2 :

$$\Delta\epsilon = \frac{l}{M d} \cdot s \cdot \Delta$$

m : masse moyenne d'un résidu (g)

s : sensibilité de l'appareil

d : épaisseur de la cellule (cm)

c : concentration (g/l)

M : concentration (mole/l)

$\Delta$  : variation de l'enregistrement (mm)

