

50376
1982
267

Numéro d'ordre : 1011

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1982
267

MEMOIRE

présenté à l'Université de Lille I
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE 3^o CYCLE EN BIOCHIMIE

par

THIERRY DUPRESSOIR

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE CINQ SOUS-FRACTIONS DE L'HISTONE H1 D'ERYTHROCYTE DE POULET — ETUDE STRUCTURALE DE LA SOUS-FRACTION H1E



présenté le 16 Décembre 1982 devant la Commission d'examen

Membres du Jury : MM. J.MONTREUIL, Président
G.BISERTE, Rapporteur
J.KREMBEL
P.SAUTIERE
Mle M.CHAMPAGNE

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

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

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES 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, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
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. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
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. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire. riques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle 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 animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

Nos recherches ont bénéficié du contrat ATP "Chromatine" C.N.R.S 4206

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

Nous remercions M.CHAMPAGNE et A.MAZEN pour la
fourniture de la fraction H1 + H5 d'érythrocyte de Poulet
grâce à laquelle ce travail a pu être réalisé.

ABREVIATIONS UTILISEES

ADP-ribose	: adénosine diphospho-ribose
DABITC	: 4,NN-diméthylaminoazobenzène 4'-isothiocyanate
DABTH-AA	: 4,NN-diméthylaminoazobenzène 4'-thiohydantoïne d'acides aminés
DMAA	: diméthylallylamine
DNA	: acide desoxyribonucléique
DNase	: desoxyribonucléase
GC	: chromatographie en phase gazeuse
GuCl	: chlorhydrate de guanidine
HMG	: high mobility group
HPLC	: chromatographie liquide à haute pression
LMG	: low mobility group
NHP	: protéine non-histone
p.b.	: paire de bases
PCA	: acide perchlorique
PITC	: phénylisothiocyanate
PTH-AA	: phénylthiohydantoïne d'amino-acide
RNA	: acide ribonucléique
r.p.m.	: rotations par minute
TCA	: acide trichloracétique
TFA	: acide trifluoroacétique
Tos Phe CH ₂ Cl	: tosyl phénylalanyle chlorométhane

TABLE DES MATIERES

	Pages
PREMIERE PARTIE	
<u>ORGANISATION DE LA CHROMATINE</u>	1
<u>I - DEFINITION - CONSTITUANTS</u>	2
A - PROTEINES NON HISTONES (NHP)	2
B - LES HISTONES	4
1 - Caractérisation	4
2 - Variabilité des histones	6
3 - Modifications post-synthétiques	9
a) Acétylation	9
b) Phosphorylation	10
c) Méthylation	11
d) ADP-ribosylation	11
e) Modification des histones H2A et H2B par liaison covalente à l'ubiquitine	12
4 - Interactions Histone-Histone	13
<u>II - STRUCTURE DE LA CHROMATINE</u>	17
A - MISE EN EVIDENCE D'UNE STRUCTURE REPETITIVE ORDONNEE	17
B - LE NUCLEOSOME - LA "CORE-PARTICLE"	17
C - POSITION ET FORME DU DNA DANS LE NUCLEOSOME ET LA "CORE-PARTICLE"	19
D - ORGANISATION DES HISTONES DANS LA "CORE-PARTICLE" ET LE NUCLEOSOME	21
E - STRUCTURE FINE DU NUCLEOSOME	22

III - <u>SUPERSTRUCTURES DE LA CHROMATINE</u>	31
IV - <u>IMPORTANCE DE L'HISTONE H1 DANS LA STRUCTURE ET L'ACTIVITE DE LA CHROMATINE</u>	36
V - <u>ROLE DES DIFFERENTS TYPES D'HISTONE H1</u>	43
BIBLIOGRAPHIE DE LA PREMIERE PARTIE	47

DEUXIEME PARTIE

<u>TRAVAIL PERSONNEL</u>	71
--------------------------	----

CHAPITRE I

ISOLEMENT, PURIFICATION, CARACTERISATION DE CINQ SOUS-FRACTIONS DE L'HISTONE H1 D'ERYTHROCYTE DE POULET

MATERIELS ET METHODES	72
I - <u>PREPARATION DES HISTONES TRES RICHES EN LYSINE</u>	73
A - Préparation et hémolyse des érythrocytes	73
B - Préparation de la chromatine	74
C - Préparation des histones très riches en lysine	74
II - <u>PURIFICATION DES HISTONES H1</u>	75
A - Chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthyl cellulose	75
B - Chromatographie de gel filtration sur Biogel P100	75
III - <u>SEPARATION DES DIFFERENTES SOUS-FRACTIONS DE L'HISTONE H1</u>	77

RESULTATS ET DISCUSSION

I - <u>PREPARATION DES HISTONES TRES RICHES EN LYSINE ET PURIFICATION DES HISTONES H1</u>	80
II - <u>SEPARATION DE DIFFERENTES SOUS-FRACTIONS D'HISTONE H1 D'ERYTHROCYTE DE POULET</u>	82

CHAPITRE II

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H1E D'ERYTHROCYTE DE POULET

I - <u>CHOIX D'UNE STRATEGIE</u>	94
II - <u>MATERIELS ET METHODES</u>	95
A - Hydrolyses enzymatiques	95
1) Hydrolyse par la pepsine	95
2) Hydrolyse par la protéase de <i>Staphylococcus aureus</i> souche V8	95
3) Hydrolyse par la trypsine	96
B - Coupure chimique	96
C - Méthodes de fractionnement des hydrolysats	97
1) Fractionnement de l'hydrolysat pepsique	97
2) Fractionnement de l'hydrolysat acétique	97
3) Chromatographie liquide à haute pression	97
D - Méthodes analytiques	98
1) Contrôle électrophorétique	98
2) Analyse d'acides aminés	99
3) Dégradation manuelle de EDMAN	99
4) Dégradation automatique de EDMAN	100

III - <u>RESULTATS</u>	101
A - Coupure de l'histone H1E par la pepsine	101
1) Etude de la fraction 1	103
2) Etude de la fraction 11	105
3) Etude de la fraction 14	112
B - Coupure de l'histone H1E par l'acide acétique 0.25M	117
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 124
 BIBLIOGRAPHIE DE LA DEUXIEME PARTIE	 126

ERRATA

Chapitre I : "Isolement, purification, caractérisation de cinq sous-fractions de l'histone H1 d'érythrocyte de poulet"

§ page 74, ligne 19; lire: Les histones H1, H5 sont alors *extraites* conjointement...

§ page 75, lignes 12-13, lire: ...éluée par NaCl 0.42 M dans le même tampon pour décrocher H1 et par HCl 0.02 M pour décrocher H5.

Chapitre II : "Etude de la structure primaire de l'histone H1E d'érythrocyte de poulet"

§ Dans III. Résultats, A. Coupure de l'histone H1E par la pepsine .

Les fractions citées 1 et 11 dans le texte (pages 101, 103, 104 et 105) sont en réalité les fractions 2 (au lieu de 1) et 12 (au lieu de 11) de la figure 15 (page 102).

§ page 110, ligne 1; lire: Le peptide Pn a d'autre part été soumis à une hydrolyse ...

PREMIERE PARTIE

ORGANISATION DE LA CHROMATINE

I - DEFINITION - CONSTITUANTS

Les cellules des Eucaryotes sont caractérisées par la présence d'un noyau bien individualisé, organite au sein duquel le DNA, porteur de l'information génétique, est associé à des protéines en un complexe appelé chromatine. Les protéines, qui représentent environ 65 p.100 du complexe peuvent être réparties en deux groupes : histones et protéines non histones.

A - PROTEINES NON HISTONES (NHP)

Cette dénomination recouvre un grand nombre de protéines, de tailles moléculaires comprises entre 9.000 et 300.000 daltons et présentes à des taux plus ou moins élevés en fonction de l'espèce et du tissu considérés (le rapport NHP/DNA peut varier de 0,5 à 1,5)(44). L'isolement et l'étude de ces protéines présentent de sérieuses difficultés en raison de leurs caractères particuliers de solubilité et de leur tendance à s'agréger.

On a pu dénombrer environ 150 protéines non histones parmi lesquelles on peut distinguer :

- des enzymes impliqués dans le métabolisme des acides nucléiques (RNA- et DNA-polymérase, endonucléase, "déroutes") ou dans celui des protéines de la chromatine (acétyltransférases, kinases, méthylases).

- des protéines contractiles (actine, myosine, tropomyosine, tubulines) (41)

- des protéines facilitant l'assemblage des structures (DNA topoisomérase, nucléoplasmine) (80)
- des phosphoprotéines
- des récepteurs d'hormones
- des protéines de structure et de régulation dont le rôle exact est encore inconnu.

La plupart des protéines non histones sont extraites de la chromatine par NaCl 0.35 M et fractionnées ensuite en deux groupes de mobilité électrophorétique différente (53) :

- Protéines LMG (low mobility group) de taille moléculaire supérieure à 30.000 daltons.
- Protéines HMG (high mobility group) de taille moléculaire comprise entre 9.000 et 28.000 daltons.

Dans la chromatine de thymus de Veau (54) les structures primaires de trois d'entre elles sont actuellement connues, il s'agit de HMG 14, HMG 17 et HMG 20 (ou ubiquitine) (157,154).

On ne connaît que partiellement les structures primaires des HMG 1 et HMG 2 (155, 156). Ces deux dernières protéines HMG se lient au DNA par leur région NH₂-terminale basique et semblent en stabiliser la structure (174).

D'autre part des interactions entre HMG 1, HMG 2 et les régions hydrophobes des histones H1, H2B et H3, ont pu être mises en évidence *in vitro* (175).

Le rôle exact des protéines HMG reste à déterminer. Pour JAVAHERIAN et coll. (67) elles pourraient modifier la structure hélicoïdale du DNA au moment de la transcription, tandis que pour YU et coll. (174) elles stabilisent cette structure.

B - LES HISTONES

1 - Caractérisation

Les histones sont des protéines de caractère basique marqué. Dans les cellules somatiques le rapport pondéral histones/DNA est de 1.

Elles se répartissent en cinq classes : H1, H2A, H2B, H3 et H4 qui représentent chacune 20 p.100 de l'ensemble des histones et dont nous avons présenté les principales caractéristiques dans le tableau I. Il est possible de les classer en trois groupes en fonction de leur solubilité et de leur rapport lysine/arginine :

Histones riches en arginine : H2A, H3 et H4.

Histones riches en lysine : H2B.

Histones très riches en lysine : H1.

En réalité, le terme d'histone H1 désigne, dans la plupart des types cellulaires, une famille de 4 ou 5 molécules de structures peu différentes.

Certains tissus cependant, ne possèdent qu'un seul type d'histone H1. C'est le cas du sperme d'Oursin (142) et du testicule de Truite (92).

Les érythrocytes nucléés des oiseaux, des batraciens, des poissons et des reptiles possèdent une histone particulière : l'histone H5 qui présente des caractéristiques proches de celles des histones H1 qu'elle remplace partiellement au cours de la maturation de l'érythrocyte.

TABLEAU I
CARACTERISATION DES HISTONES

	H1 (Sous-fraction 3 de thymus de Lapin)	H5 (érythrocyte de Poulet)	H2B (thymus de Veau)	H2A (thymus de Veau)	H3 (thymus de Veau)	H4 (thymus de Veau)
Masse moléculaire	22.000	20.580	13.774	14.005	15.324	11.282
Nombre de résidus	212	189	125	129	135	102
Rapport Basiques/Acides	5,7	15	1,93	1,5	1,65	2,45
Rapport Lys/Arg	15,2	2,23	2,5	1,16	0,72	0,78
NH ₂ -terminal	Ac-Ser	Thr (Ac-Thr 15%)	Pro	Ac-Ser	Ala	Ac-Ser
COOH-terminal	Lys	Lys	Lys	Lys	Ala	Gly
Caractéristiques structurales	3 domaines 1 domaine NH ₂ -terminal basique, inorganisé et variable 1-36 1 domaine central hydrophobe globulaire et conservé. 37-120 1 domaine COOH-terminal très basique, inorganisé et variable 121-212	3 domaines 1-21 22-99 100-189	3 domaines 1 domaine NH ₂ -terminal très basique, peu structuré 1-31 1 domaine hydrophobe, globulaire, très conservé 32-125 1 domaine COOH- terminal basi- que, variable et peu organisé 119-129	2 domaines 1-17 18-118	2 domaines 1 domaine NH ₂ -terminal basique, peu organisé 1-27 1-19 1 domaine COOH-terminal hydrophobe, structuré 28-135 20-102 Les 2 histones H3 et H4 sont remarquablement conservées.	



Les histones ne contiennent pas de tryptophane et sont très pauvres en acides aminés aromatiques et soufrés. Seule l'histone H3 contient de la cystéine (1 ou 2 résidus suivant les espèces).

L'histone H4 des Echinodermes, qui contient 1 résidu de cystéine (151, 172) semble constituer un cas particulier.

La figure 1 nous permet de nous rendre compte de la répartition des acides aminés dans les histones.

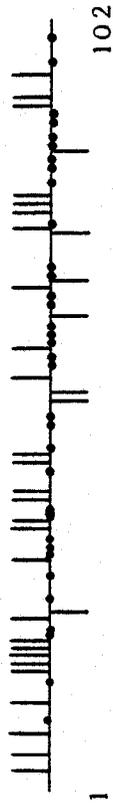
L'histone H1 présente une accumulation de résidus basiques dans la zone COOH-terminale de la protéine alors que nous pouvons constater une distribution inverse des résidus basiques dans les histones H2A, H2B, H3 et H4 où ceux-ci sont accumulés, par groupes de 2 ou 3, dans les zones NH₂-terminales.

2 - Variabilité des histones

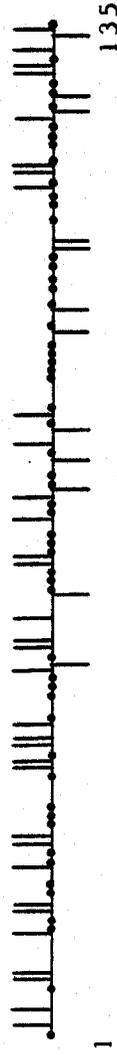
La structure primaire des histones H2A, H2B, H3 et H4 est maintenant parfaitement connue pour plusieurs espèces et différents tissus (153).

On connaît également les séquences complètes des histones H5 d'érythrocyte d'Oie (173) et de Poulet (20) et des histones H1 de testicule de Truite (92) et du sperme d'Oursin (172). Mais aucune des sous-fractions H1 de thymus de Lapin ou de thymus de Veau n'a sa séquence totalement déterminée. On ne connaît généralement que la séquence des 100-120 premiers résidus ; c'est pour la sous-fraction 3 de thymus de Lapin (RTL-3) que les travaux de détermination de séquence ont été menés le plus loin (68, 32).

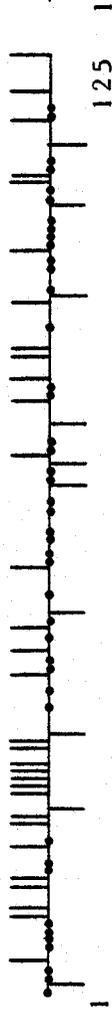
H4 (Thymus de Veau)



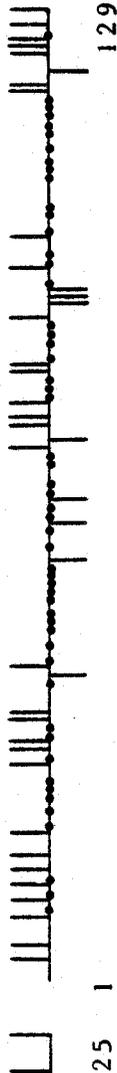
H3 (Thymus de Veau)



H2B (Thymus de Veau)



H2A (Thymus de Veau)



H1 (RTL.3) (Thymus de Lapin)

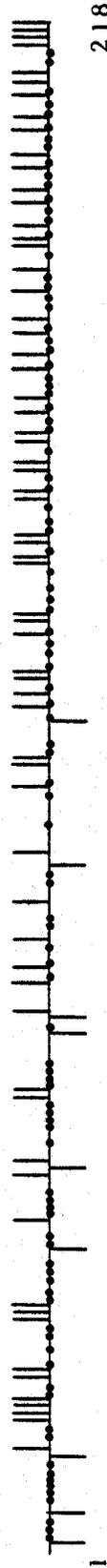


FIGURE 1

DISTRIBUTION DES RESIDUS BASIQUES (), ACIDES () ET HYDROPHOBES () DANS LES HISTONES

Comparativement aux autres histones, les histones très riches en lysine ont été peu étudiées sur le plan structural, probablement en raison de difficultés d'ordre préparatif dans la séparation des différentes sous-fractions de H1 et d'ordre méthodologique dans la détermination de leur séquence.

L'histone H1 possède la séquence en acides aminés la plus variable. Les différences sont nombreuses non seulement entre les histones H1 de deux espèces différentes mais encore entre les sous-fractions de H1 d'un même tissu.

Les histones H3 et H4, par opposition, possèdent les structures les plus hautement conservées. Le taux de mutation de l'histone H4 n'est que de 0,06 mutations/100 résidus/100 millions d'années.

Les structures primaires des histones H2A et H2B ont une variabilité intermédiaire avec 1,5 mutations/100 résidus/100 millions d'années.

On observe généralement peu de changements dans les zones hydrophobes de ces protéines : en fait ces zones hydrophobes sont impliquées dans des interactions protéine-protéine fondamentales pour l'organisation structurale et la fonction de la chromatine.

Les zones les plus variables des histones se situent donc dans les zones NH_2 -terminales (pour H2A et H2B) basiques, siège probable des interactions électrostatiques avec les charges négatives des groupes phosphate du DNA.

3 - Modifications post-synthétiques

Les zones basiques des histones, interagissant avec le DNA, font l'objet d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles qui modifient soit la charge locale de la molécule protéique, soit son environnement.

Les différentes modifications post-synthétiques connues qui affectent les histones sont au nombre de cinq : acétylation, phosphorylation, méthylation, poly(ADP-ribosylation) et liaison covalente à l'ubiquitine.

a) Acétylation

L'acétylation affecte les zones NH_2 -terminales des histones H3 et H4 et à un degré moindre des histones H2A et H2B (40).

Elle est irréversible quand elle affecte le groupe α -aminé terminal des histones H1, H2A et H4.

Elle est réversible quand elle affecte le groupe ϵ -aminé des résidus de lysine en position intracaténaire.

L'acétylation des histones est vraisemblablement liée à l'activation des régions transcrites du DNA (5) mais son rôle exact est assez controversé.

L'acétylation des résidus de lysine entraîne d'abord la perte de charges positives supprimant ainsi les interactions électrostatiques de ces résidus avec le DNA. Il a pourtant été montré qu'une acétylation, même poussée, n'affecte

nullement la stabilité du complexe nucléoprotéique (97). D'autre part, l'acétylation des histones provoquerait une augmentation de la sensibilité du DNA aux endonucléases (152, 97).

Il semblerait enfin, que l'hyperacétylation de l'histone H4 tende à déstabiliser la structure de la chromatine inactive afin de permettre la transcription (25) et que l'acétylation de l'histone H3 constitue un préalable à la phosphorylation de cette même protéine (166).

b) Phosphorylation

Cette modification peut affecter toutes les histones, elle intervient au niveau du groupe hydrophobe des résidus de sérine et thréonine. Différents travaux ont conduit à lier la phosphorylation des histones et la mitose. Ainsi dans une culture de cellules de la lignée CHO (cellules ovariennes de Hamster chinois) l'évolution de l'organisation chromatinienne a pu être corrélée avec différents états de phosphorylation des histones H1, H3 et H2A (57, 58).

Pendant l'interphase, l'histone H1 possède de 1 à 3 résidus de sérine phosphorylée dans la partie COOH-terminale de la molécule. Cette histone H1i (Interphasique) caractérise un stade d'organisation préparatoire à la division cellulaire.

Durant la métaphase, l'histone H1 est hyperphosphorylée. Cette histone H1m (Métaphasique) possède de 4 à 6 sites phosphorylés, aussi bien sérine que thréonine, répartis dans les

régions terminales basiques de la molécule. Simultanément, on trouve une histone H3m phosphorylée qui comme H1m est associée à la présence de chromosomes hautement condensés.

Une histone H2A phosphorylée existe tout le long du cycle cellulaire de la lignée CHO. Elle est probablement associée à la condensation de la chromatine non transcrite (hétérochromatine).

c) Méthylation

Phénomène plus limité, la méthylation affecte uniquement les résidus de lysine des histones H3 et H4. Les deux sites de méthylation de l'histone H3 sont proches des sites de phosphorylation, dans la zone NH₂-terminale de cette protéine (40). Cette modification semble irréversible (148) et elle viendrait renforcer l'interaction histone-DNA (21). Il faut cependant remarquer que les histones H1 et H5 d'érythrocyte de Canard ont été trouvées méthylées (48).

d) ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation affecte principalement les histones H2B et H1, les histones H2A, H3 et H4 étant modifiées à un degré moindre (104).

Une molécule d'ADP-ribose se lie de façon covalente à la protéine. D'autres molécules d'ADP-ribose peuvent ensuite se fixer, en présence de poly-(ADP-ribose) polymérase, sur

l'ADP-ribosyl lié à la protéine. On obtient ainsi des chaînes de poly(ADP-ribose) de longueurs très variables. L'addition de tels polymères à la protéine entraîne probablement des modifications physiques et biologiques de la chromatine sans qu'il soit encore possible de préciser lesquelles. Les sites d'ADP-ribosylation *in vitro* des histones H1 et H2B de foie de Rat ont été récemment identifiés. Il s'agit pour l'histone H2B (107) du résidu d'acide glutamique en position 2 et pour l'histone H1, des résidus d'acide glutamique en position 2 et 14 et du résidu de lysine COOH-terminal (108). Les chaînes de poly(ADP-ribose) sont fixées sur le groupe γ -carboxylique de l'acide glutamique et sur le groupe α -carboxylique de la lysine.

e) Modification des histones H2A et H2B par liaison covalente à l'ubiquitine

L'ubiquitine (ou protéine HMG 20) modifie environ 10 p.100 de l'histone H2A pour former la protéine A24 (u-H2A) (50,51). Récemment on a découvert qu'une telle modification pouvait affecter aussi l'histone H2B (seulement 1,5 p.100) pour former la protéine u-H2B (165).

Dans la protéine A24, le résidu d'arginine en position COOH-terminale de l'ubiquitine est lié au groupement ϵ -NH₂ de la lysine 119 de l'histone H2A, par l'intermédiaire d'un mail-
lon dipeptidique glycyl-glycyl.

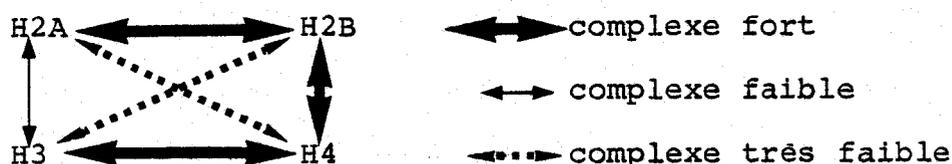
les techniques classiques de physico-chimie (résonance magnétique nucléaire, spectroscopie infra-rouge, dichroïsme circulaire) qui peuvent être utilisées aussi bien avec les protéines qu'avec des peptides de caractéristiques bien définies. L'ensemble de ces méthodes a conduit à l'identification des régions les plus structurées dans les zones hydrophobes des histones (cf Tableau I). Les zones basiques ne sont pas organisées. Or, on pense depuis longtemps que les nombreux résidus basiques des histones sont engagés dans des interactions électrostatiques avec les groupes phosphate du DNA. Les interactions protéine-protéine seraient donc localisées dans les zones moléculaires les plus structurées c'est-à-dire les zones hydrophobes.

On peut noter cependant que cette dissymétrie fonctionnelle des histones doit être parfois nuancée : ainsi dans les histones H3 et H4 les régions basiques hautement conservées seraient impliquées à la fois dans des interactions électrostatiques avec le DNA et des interactions protéine-protéine d'un type particulier (138).

Les interactions histone-histone ont tout d'abord été illustrées par la tendance à l'auto-agrégation de ces protéines en milieu de pH et de force ionique élevés (84), mais ce phénomène ne semble pas avoir d'incidence physiologique particulière.

D'autres types d'interactions ont pu être mis en évidence dès 1972 (134, 71) lorsqu'un dimère H2A-H2B fut identifié. Des complexes H2A-H2B (75), H3-H4 (75, 124), H2B-H4 (103) ont pu

être caractérisés par la suite et une étude alliant diverses méthodes physiques (anisotropie de fluorescence, diffusion de la lumière et dichroïsme circulaire) a permis à D'ANNA et ISENBERG (35) de résumer les spécificités d'interaction entre les histones H2A, H2B, H3 et H4 en mélange.



Des expériences de pontage interprotéique avec le diméthylsubérimidate (149, 136) ont permis de figer la structure du polymère d'histones *in vitro* et ont montré que les histones H3 et H4 s'assemblent en un tétramère (H3-H4)₂ alors que H2A et H2B s'unissent pour former un dimère H2A-H2B.

L'étude de la résonance magnétique du proton appliquée aux résidus aromatiques de fragments d'histones (100, 12, 19) a permis de délimiter les régions impliquées dans ces diverses interactions. Ainsi les histones H3 et H4 interagissent par l'intermédiaire des régions 42 à 120 pour la première et 38 à 102 pour la seconde. La digestion trypsique de la chromatine d'érythrocyte de Poulet suggère par ailleurs que ces zones d'interaction pourraient se situer entre les résidus 27 à 129 de l'histone H3 et 20 à 102 de l'histone H4 (14).

La zone 31 à 95 de l'histone H2A interviendrait dans une interaction avec la zone 32 à 114 de H2B (19).

Les zones d'interaction entre les histones H2A et H2B ont pu être précisées. D'une part dans notre laboratoire, COUPPEZ a déterminé que les zones 21 à 118 de H2A et 32 à 125 de H2B de thymus de Veau sont indispensables à la formation du dimère (résultats non encore publiés).

D'autre part, BÖHM et coll. ont montré que, dans la chromatine d'érythrocyte de Poulet, les 11 résidus NH_2 -terminaux et les 10 résidus COOH -terminaux de l'histone H2A sont exposés à l'action de la trypsine (13) suggérant ainsi que la zone globulaire (12 à 118) interagirait avec la zone 24 à 125 résistante à la protéolyse de l'histone H2B (15). Ces deux approches sont tout à fait concordantes et complémentaires.

Ces interactions sont tributaires de la modification d'un seul des résidus de la zone interagissante. Ainsi l'oxydation des groupes thiols de l'histone H3 empêche-t-elle la formation d'un complexe avec H4. De même l'oxydation des résidus de méthionine de l'histone H2B, en méthionine sulfoxyde et méthionine sulfone empêche la formation du dimère H2A-H2B.

Ces interactions purement protéiques ne prennent toutefois leur pleine signification qu'en présence du DNA, c'est-à-dire dans la structure de la chromatine.

II - STRUCTURE DE LA CHROMATINE

A - MISE EN EVIDENCE D'UNE STRUCTURE REPETITIVE ORDONNEE

Bien avant de connaître les interactions protéine-protéine, des études de diffraction des rayons X (168) ont permis de mettre en évidence une structure périodique de la chromatine. De plus cette structure se retrouve lorsqu'on mélange du DNA et des histones (90) suggérant ainsi que ces protéines sont bien responsables de la formation de complexes constituant la "maille élémentaire" d'une structure répétitive ordonnée.

On a d'abord pensé que le DNA était enroulé en une super-hélice stabilisée par les histones. Le pas de cette super-hélice était alors considéré comme l'unité élémentaire.

B - LE NUCLEOSOME - LA "CORE-PARTICLE"

Le traitement de la chromatine par une endonucléase extraite de *Staphylococcus aureus* (E.C.3.1.4.7) a permis de montrer que les histones protègent partiellement le DNA de la coupure enzymatique, les fragments obtenus ayant une longueur variant entre 200 paires de bases (p.b) et les multiples de cette valeur (62).

La structure en "perles sur un fil" du DNA peut d'ailleurs être visualisée en microscopie électronique et les

"perles" protéiques associées au DNA ont été nommées "v bodies" (111), "P.S.particles" (125) ou encore nucléosomes (112). Cette dernière dénomination a été universellement reconnue et elle désigne un complexe de DNA et d'histones. Le DNA de ces particules possède une longueur variable suivant les organismes d'origine (245 p.b. dans la chromatine de sperme d'Oursin (70), 200 p.b. environ chez les mammifères, 140 seulement chez *Aspergillus* (77)). Les histones sont assemblées en un octamère constitué de deux fois chacune des 4 molécules H2A, H2B, H3 et H4 (76). La cinquième histone, H1, présente dans le nucléosome n'est pas incluse dans ce polymère protéique, mais elle est directement associée au DNA.

L'interprétation des spectres de diffraction des rayons X fut encore affinée grâce à la technique de diffusion des neutrons (7) qui permit d'affirmer que les bandes de diffraction caractéristiques de l'unité répétitive étaient bien dûes aux protéines du nucléosome.

La particule ainsi définie semblait être l'unité structurale élémentaire de la chromatine. Toutefois, la variabilité de la longueur du DNA impliqué dans cette organisation d'une part et l'existence ou l'absence de l'histone H1 d'autre part laissaient penser que le nucléosome pouvait être mieux défini.

Une hydrolyse plus poussée de la chromatine par la nucléase de microcoque a permis de caractériser une particule dont la longueur de DNA est la même quel que soit l'organisme: la "core-particle" (76).

Celle-ci contient 146 paires de bases de DNA associées à deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4 assemblées en octamère (119).

Le DNA non inclus dans la "core-particle", de longueur variable suivant l'origine cellulaire est appelé DNA inter-nucléosomique, ou DNA "linker", ou encore DNA "spacer".

Le nucléosome peut donc être défini comme l'ensemble formé par la "core-particle" et le DNA "linker" associé à une molécule d'histone H1.

C - POSITION ET FORME DU DNA DANS LE NUCLEOSOME ET LA "CORE-PARTICLE"

Dès les premiers travaux utilisant les nucléases, les polynucléotides obtenus ont démontré clairement l'accessibilité du DNA aux enzymes, autrement dit une position externe du DNA dans le nucléosome et la "core-particle" (106).

Ce fait a été confirmé par l'utilisation de la méthode de variation des contrastes en diffusion des neutrons (7, 11) appliquée à l'étude de "core-particles" en solution (7) ou cristallisées (11).

Des travaux de diffraction des rayons X par des cristaux de "core-particles" ont permis de proposer pour le DNA de cette structure un modèle en super-hélice de 1,75 tour pour 140 paires de bases (80 p.b./tour), de 90 Å de diamètre et de 28 Å de pas (46) (Figure 2a).

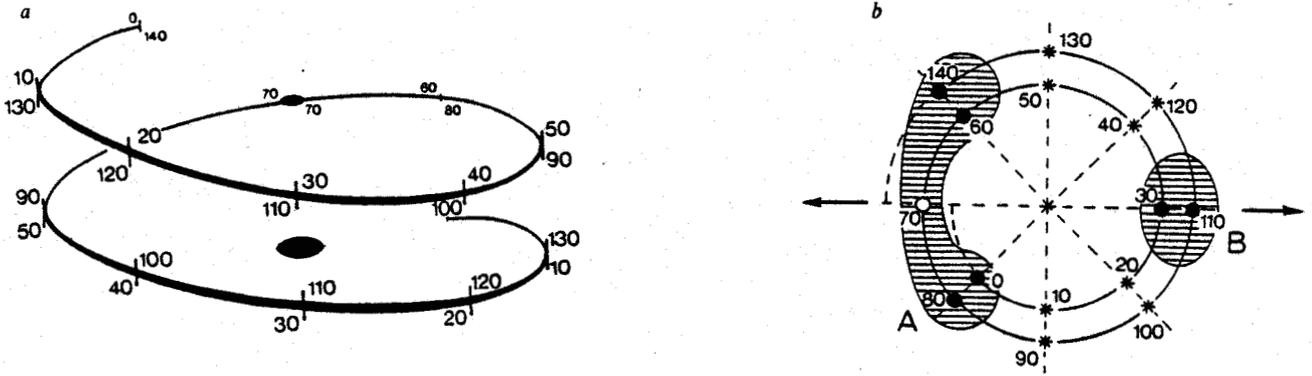


FIGURE 2 a Représentation schématique de 1.75 tour de DNA superhélicoïdal pour 140 paires de bases.

b Les mêmes 140 paires de bases sont représentées en spirale ; les zones hachurées matérialisent le regroupement de sites sensibles à la DNase I.

selon FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUSHTON, B., LEVITT, M. and KLUG, A. (1977)
Nature, 269, 29-36.

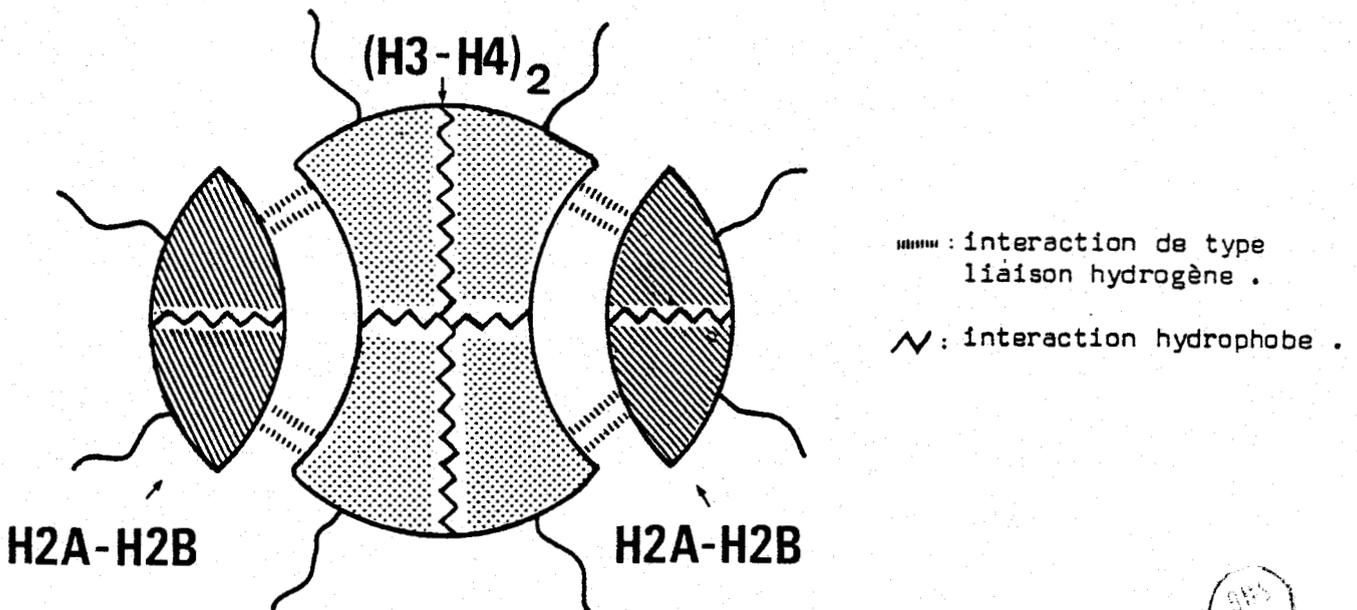


FIGURE 3 Représentation schématique des interactions histone-histone dans la "core-particule".

selon EICKBUSH, T.E. and MOUDRIANAKIS, E.M. (1978)
Biochemistry, 23, 4955-4964.

L'étude des fragments produits par digestion de la chromatine à l'aide de la DNase I (E.C.3.1.4.5) (89,129) a montré que des sites placés à 30, 60, 80 et 110 nucléotides de l'extrémité 5' du DNA de la "core-particle" sont partiellement protégés du clivage. Ceci suggère que ces sites sont couverts par les histones.

D'autre part, et ceci concorde avec le modèle de la figure 2b, ces sites peuvent être rapprochés deux par deux (exemple : 30 et 110).

D - ORGANISATION DES HISTONES DANS LA "CORE-PARTICLE" ET LE NUCLEOSOME

Nous avons déjà vu que les histones s'associent en octamère $(H3)_2-(H4)_2-(H2A-H2B)_2$ et ceci même en solution dans des conditions de force ionique élevée (149).

Un modèle plus précis a été proposé récemment (43) qui fait intervenir deux types différents d'interaction entre les paires d'histones (Figure 3). Dans le coeur protéique de la "core-particle" le tétramère $(H3)_2-(H4)_2$ serait maintenu assemblé par des interactions hydrophobes fortes. Deux dimères compacts $(H2A-H2B)$ seraient liés à ce noyau par des liaisons hydrogène. Le tétramère $(H3)_2-(H4)_2$ joue un rôle principal de structuration du DNA au sein du complexe. En effet, il semble suffisant pour former les structures similaires à celle du nucléosome (17). Les dimères $H2A-H2B$ viendraient alors seulement stabiliser la structure.

De plus les zones basiques, non organisées, des histones de la "core-particle" ne semblent pas utiles à la structuration de la chromatine qui garde ses caractéristiques après digestion tryptique de ces fragments (159). Ces zones NH_2 -terminales, nous l'avons déjà vu pour les histones H3 et H4 donneraient lieu à des interactions particulières protéine-DNA et protéine-protéine (138). Il faut toutefois remarquer que des travaux récents semblent impliquer ces zones basiques non structurées dans la formation des polynucléosomes (4).

Le mélange des 4 histones de la "core-particle" à force ionique élevée conduit à l'obtention de structures tubulaires formées par l'empilement d'octamères (74).

L'étude de ces structures en microscopie électronique à 22 Å de résolution a permis de définir l'octamère comme un disque plus épais d'un côté et possédant un axe de symétrie d'ordre 2 (Figure 4). Cet octamère constitue une bobine hélicoïdale gauche autour de laquelle viendrait s'enrouler la super-hélice de DNA.

E - STRUCTURE FINE DU NUCLEOSOME

Les premières études en microscopie électronique (78) faisaient apparaître le nucléosome comme un disque de 135 Å de diamètre et 55 Å d'épaisseur.

L'étude de la diffraction des rayons X par les cristaux de "core-particles" (46, 47) a décrit cette particule comme un disque de 100 Å de diamètre et de 55 Å d'épaisseur.

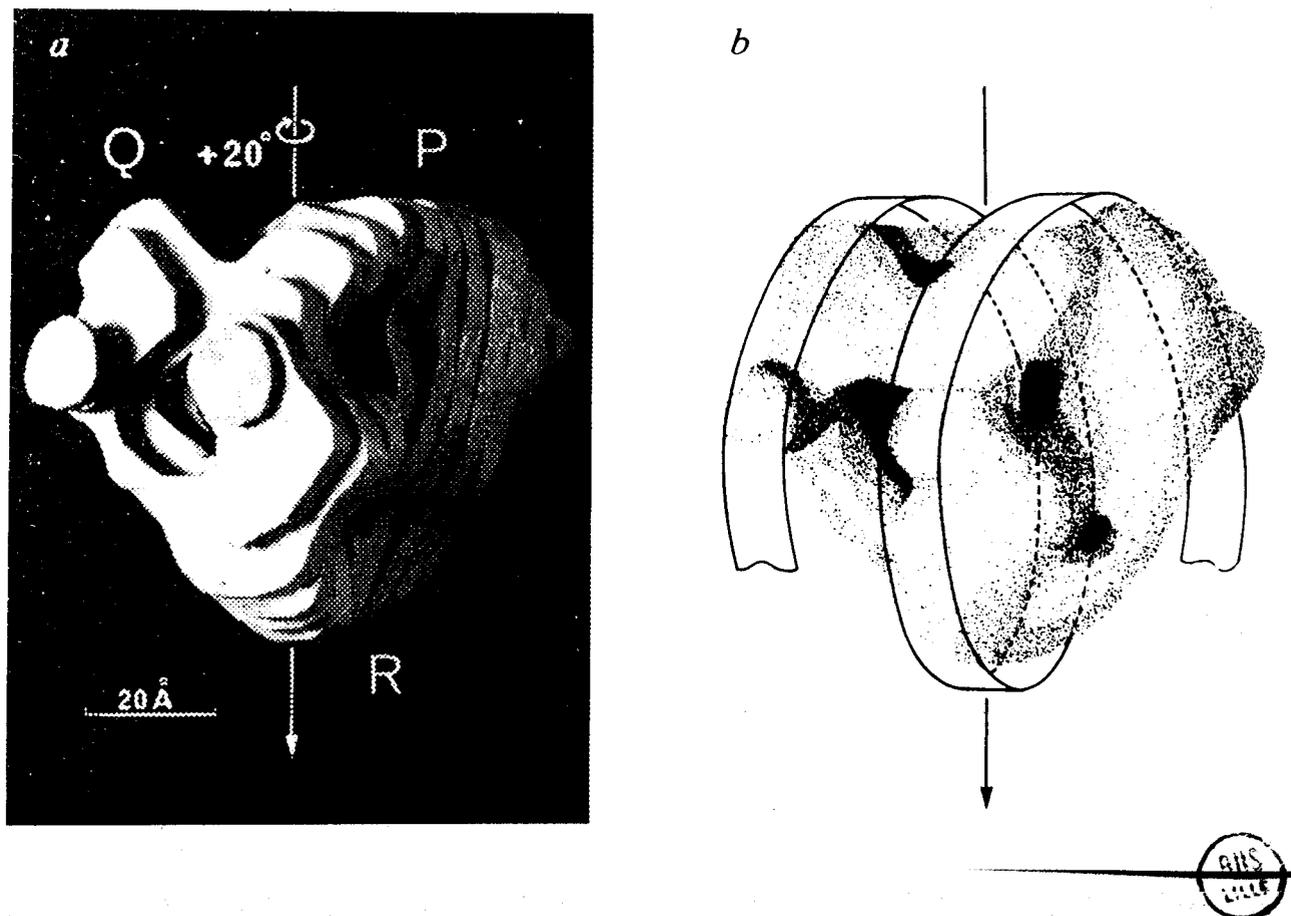


FIGURE 4 a Modèle proposé pour la structure spatiale des histones dans la "core-particle".

b Schéma de la même structure et matérialisation du "rail" protéique autour duquel vient s'enrouler le DNA.

Selon KLUG, A., RHODES, D., SMITH, J., FINCH, J.T. and THOMAS, J.O. (1980)
Nature, 287, 509-516.

Les expériences de pontage entre les histones (23, 95, 96, 149) ont conduit à proposer des modèles tridimensionnels d'arrangement des histones dans la "core-particle" ou le nucléosome.

D'autre part, une carte de la répartition des histones le long du DNA a pu être réalisée à partir d'une astucieuse méthode de fixation des protéines sur l'acide nucléique élaborée par MIRZABEKOV et ses collaborateurs (98, 128). Une partie des bases du DNA est méthylée par le diméthyl sulfate puis dépurinée à 45°C pendant 8 heures. Les fonctions aldéhyde ainsi démasquées se lient au groupe ϵ -NH₂ des résidus de lysine des histones et les bases de SCHIFF ainsi formées sont stabilisées par réduction au tétraboro-hydrure de sodium (Figure 5a).

Les résultats obtenus par cette méthode sont reportés sur la figure 5b.

La synthèse de ces résultats a été effectuée récemment par KLUG et coll. (74) pour compléter la carte tridimensionnelle de la "core-particle" obtenue par interprétation des images de microscopie électronique d'octamères d'histones. Le modèle proposé est présenté dans la figure 6.

Ce modèle rend parfaitement compte de la forme en coin de la "core-particle" et de la disposition des histones pour former un "rail" hélicoïdal le long duquel s'enroule la double hélice de DNA.

L'élément principal de ce rail est constitué par le tétramère (H3)₂-(H4)₂ dont la forme en fer à cheval, de 27 Å

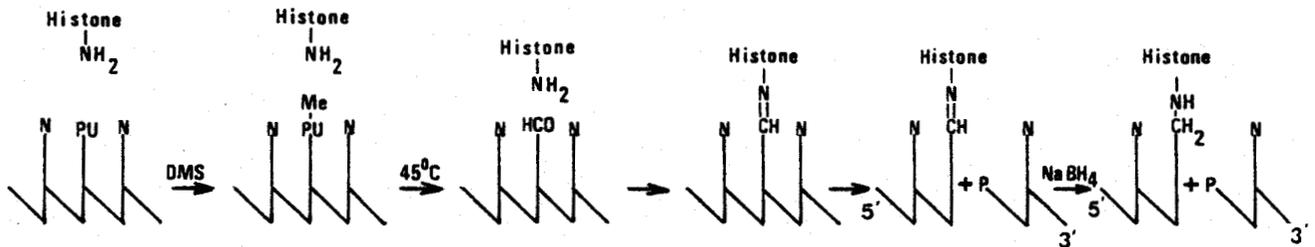


FIGURE 5 a Schéma réactionnel de pontage histone-DNA et de coupure du DNA simple brin au point de liaison. DMS = diméthylsulfate ; PU = base purique.

d'après MIRZABEKOV, A.D., SHICK, V.V., BELYAVSKY, A.V. and BAVYKIN, S.G. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4184-4188.

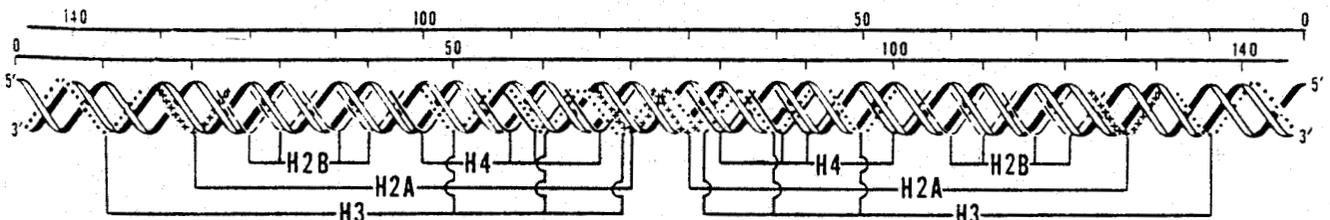


FIGURE 5 b Modèle linéaire de la "core-particle".

d'après MIRZABEKOV et coll. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4184-4188.

Dans ce modèle, l'ordre linéaire des histones le long de la chaîne de DNA est le suivant : H2A, H2B, H4, H3, H3, H4, H2B, H2A.



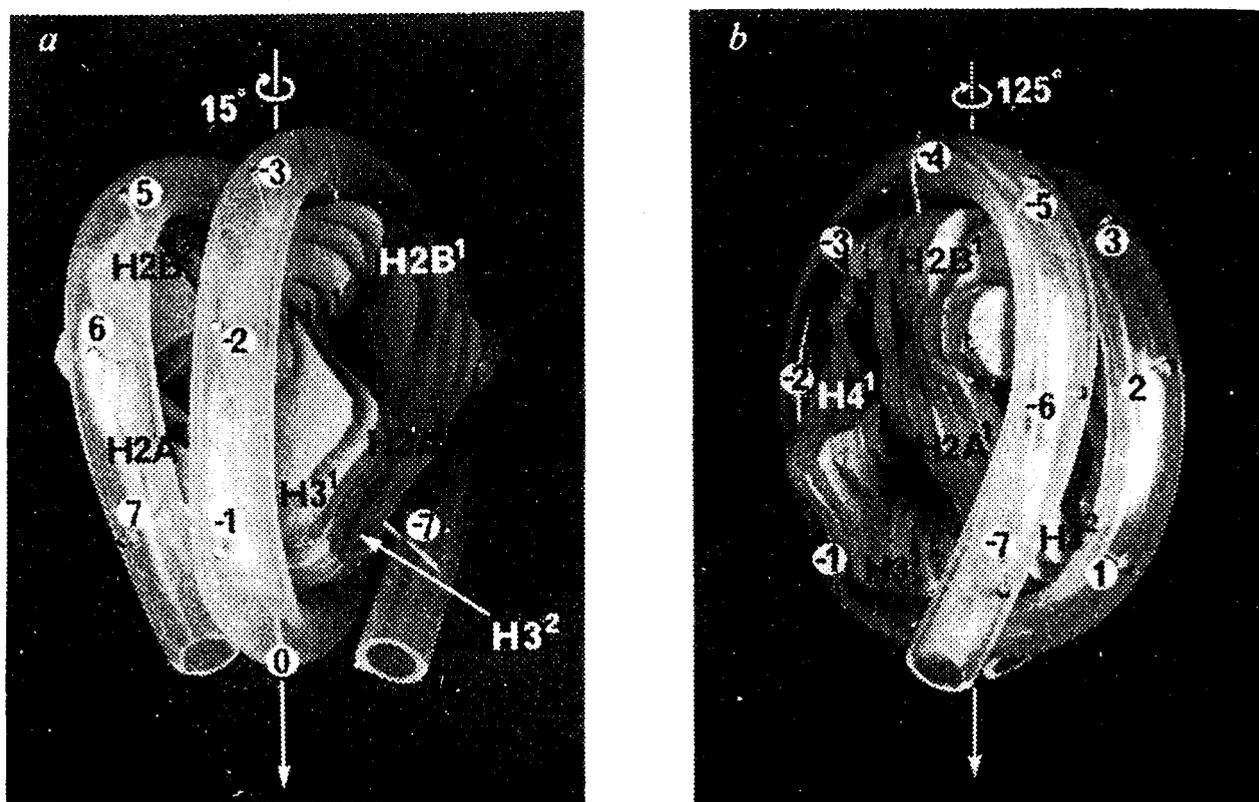


FIGURE 6 Modèle proposé pour la structure tridimensionnelle de la "core-particle". Les chiffres indiqués sur le DNA correspondent à peu près aux sites sensibles à la DNase I. Le 0 correspond à l'axe de symétrie du modèle.

d'après KLUG, A. and coll. (1980)
Nature, 287, 509-516.

d'épaisseur, est tout à fait compatible avec la contrainte de 80 p.b. de DNA en 1 tour de super-hélice. Il n'est pas impossible que ce tétramère soit suffisant pour fixer le reste du DNA, les dimères H2A-H2B venant alors stabiliser cette structure.

Le modèle proposé est celui de la "core-particle", c'est-à-dire l'octamère d'histones autour duquel viennent s'enrouler 146 p.b. de DNA, en super-hélice. On peut toutefois extrapoler ces résultats aux particules de structure plus complexe.

Ainsi le chromosome (130) ou nucléosome minimum se définit comme un octamère autour duquel sont enroulées 166 p.b. de DNA. Cette particule comporte en outre une molécule de l'histone H1 (ou H5). La longueur de DNA dans le chromosome permet la formation de 2 tours complets de super-hélice autour du coeur protéique et les 20 paires de bases supplémentaires sont liées aux extrémités NH₂- et COOH-terminales (respectivement 30 et 100 résidus) de l'histone très riche en lysine.

La localisation de l'histone H1 dans la chromatine a pu être étudiée par des voies différentes.

La sensibilité de cette histone aux protéases est depuis longtemps connue (30, 112, 159) ainsi que son extraction de la chromatine par une concentration saline relativement faible (0.5M NaCl contre 1.5M NaCl pour les autres histones) (109, 167).

Ces résultats suggèrent que l'histone H1 est plus accessible que les histones de la "core-particle". L'étude de la

diffusion des neutrons par la chromatine a permis de placer l'histone H1 en position externe dans le nucléosome (7).

Par ailleurs des auteurs se sont attachés à déterminer, à l'aide d'agents de pontage, la position proximale ou distale des histones de la "core-particle" par rapport à l'histone H1. L'utilisation d'agents courts comme les carbodiimides a permis d'établir une étroite proximité entre la région COOH-terminale de l'histone H2A et la zone globulaire de l'histone H1 (16, 18, 66). Mais il est à noter que des polymères H1-H3 ont été mis en évidence de façon significative dans certaines conditions (122).

L'étude des coefficients de sédimentation de chromatines reconstituées comprenant divers fragments de l'histone H1 a permis de montrer que le domaine globulaire (36 à 121) de l'histone H1 a la forme d'une sphère de 29 Å de diamètre, dont la structure fine serait modulée par les extrémités basiques non structurées (8) et qui viendrait verrouiller les 2 tours de super-hélice du DNA du chromatosome (3). Le modèle établi à partir de ces travaux est présenté dans la figure 7.

Un travail récent a permis de montrer en outre que l'histone H1 est responsable de la protection d'une partie du DNA de la "core-particle" contre l'action de la nucléase de microcoque (66). Tous ces résultats s'accordent à reconnaître à l'histone H1 un rôle primordial, non seulement dans la stabilisation du DNA-linker (34) mais aussi dans la stabilisation du nucléosome lui-même.

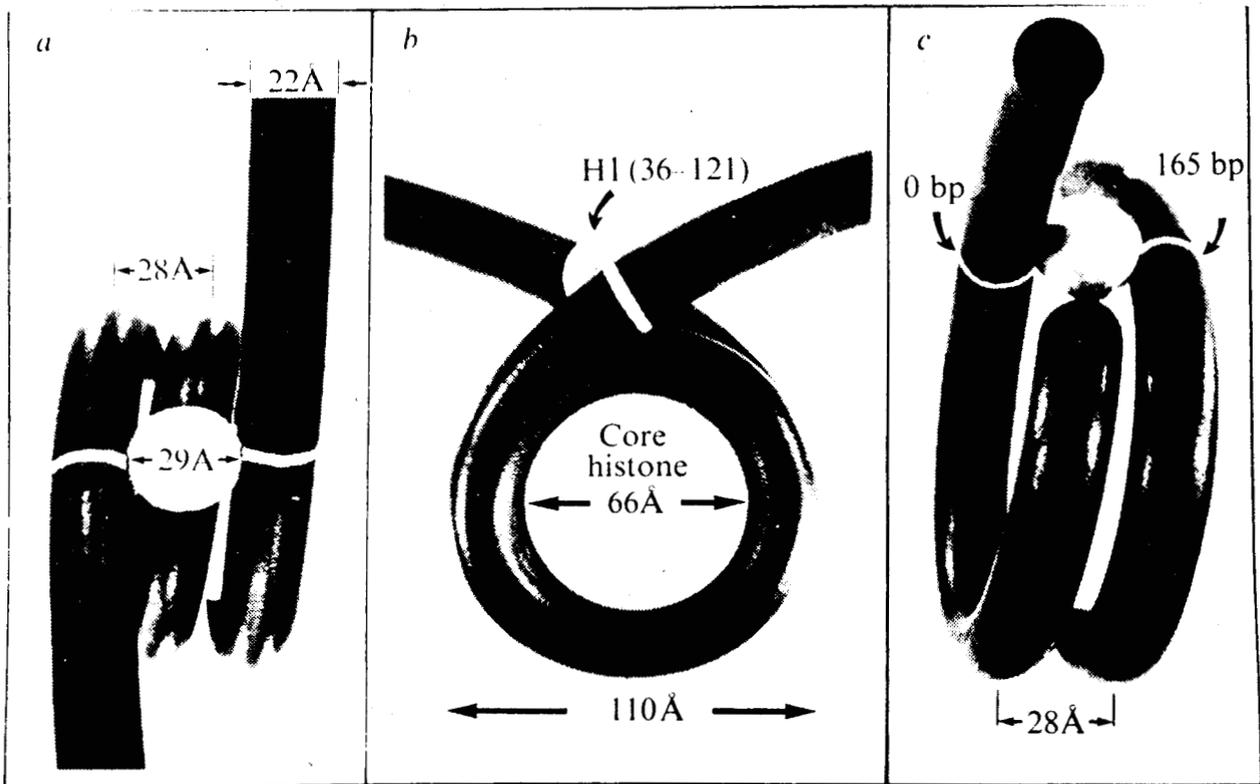


FIGURE 7 Modèle proposé pour la localisation du domaine globulaire de l'histone H1 (ou de l'histone H5) dans le chromatosome.

(bp = paire de bases de DNA)

d'après ALLAN, J., HARTMAN, P.G., CRANE-ROBINSON, C. and AVILES, F.X. (1980)
Nature, 288, 675-679.

On peut donc redéfinir le nucléosome de la façon suivante (146) :

- 166 paires de bases de DNA + les 8 molécules d'histones de la "core-particle" + 1 molécule de H1 (ou H5) forment un nucléosome minimum (chromatosome) de façon invariable et universelle.

- le DNA "linker", de longueur variable, contient le reste du DNA également réparti de part et d'autre du chromatosome.

A l'unité structurale ainsi définie s'associent probablement des protéines HMG (6, 38, 55) différemment réparties, introduisant ainsi une hétérogénéité morphologique des nucléosomes (1, 82).

Il a été possible, par des travaux de pontage (122) de mettre en évidence la présence de protéines HMG "légères" (HMG 14 et HMG 17) dans le nucléosome. Deux sites de fixation, pouvant accueillir indifféremment l'une ou l'autre de ces protéines, ont pu être déterminés sur le DNA nucléosomal (2, 93). Ces sites sont différents du site de fixation de l'histone H1 et les trois types de protéines peuvent coexister dans un nucléosome. Les protéines HMG "lourdes" (HMG 1 et HMG 2), pour leur part, semblent interagir avec le DNA (174) et plus particulièrement le DNA monocaténaire (65), mais aussi avec les zones globulaires hydrophobes (175) de certaines sous-fractions de l'histone H1 (135).

III - SUPERSTRUCTURES DE LA CHROMATINE

(Arrangements d'ordre supérieur au nucléosome)

Grâce à la microscopie électronique, il a été possible d'observer l'image maintenant classique du "collier de perles" ou fibre de 100 Å de diamètre, dans la chromatine.

Cette première observation de l'arrangement de polynucléosomes a été suivie de nombreuses autres qui ont permis de définir plusieurs types de superstructures de la chromatine. Nous n'envisagerons ici que deux des modèles tirés de ces observations.

Une hydrolyse douce de la chromatine, par la nucléase de microcoque (E.C.3.1.4.7), suivie d'un fractionnement de l'hydrolysate par centrifugation en gradient de saccharose a permis d'obtenir des polynucléosomes de tailles différentes, multiples de 8 unités (141). Ceci correspondrait à une structure dite en "superbeads" (121) : chaque "superbead" serait formée par l'assemblage compact de 6 à 8 nucléosomes et son diamètre serait compris entre 200 et 300 Å.

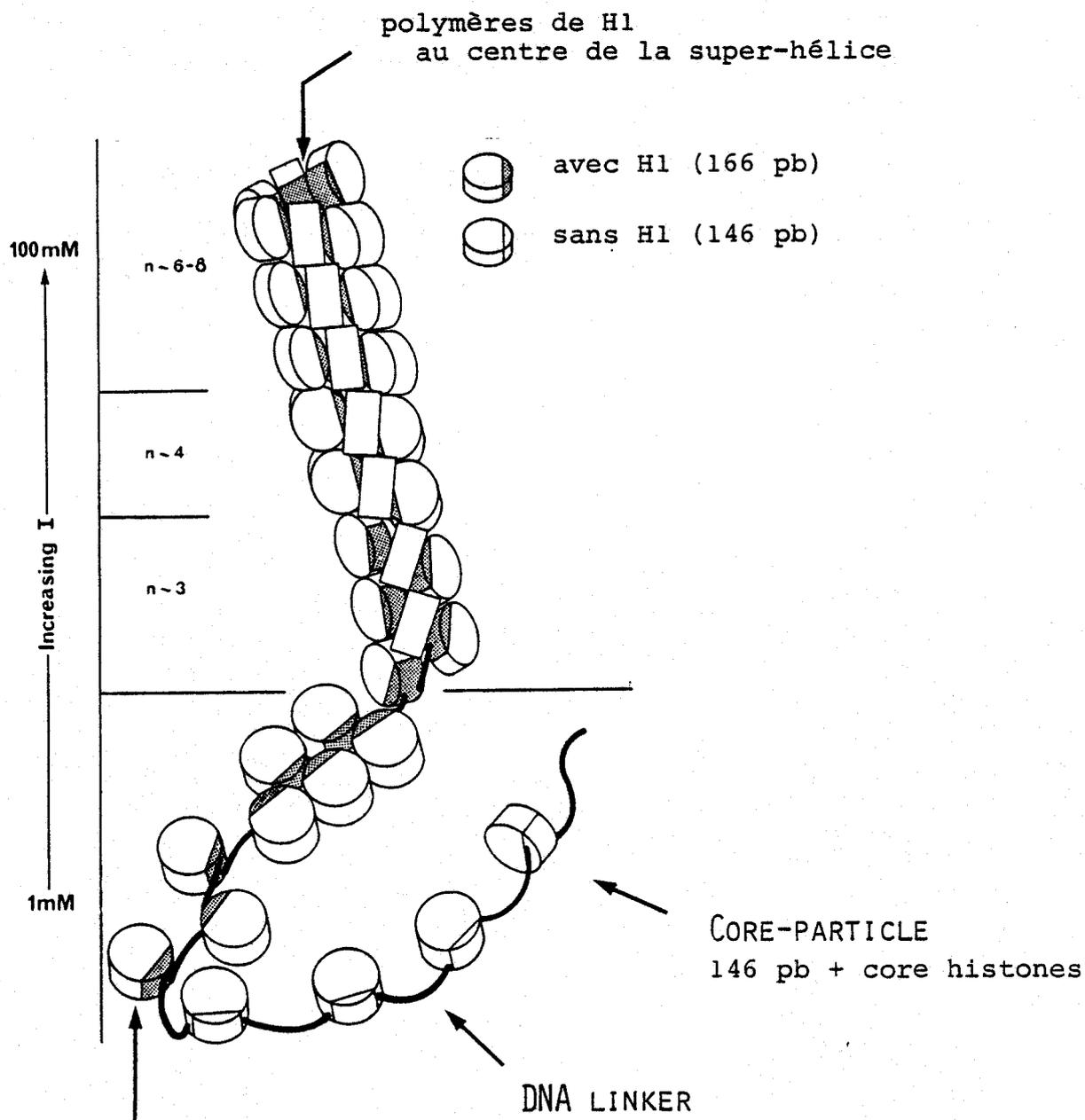
Ces particules ont pu être observées en microscopie électronique (63) et semblent s'arranger le long du DNA en globules régulièrement répartis tous les 200-300 Å (103, 141). De telles fibres chromatiniennes ont même pu être reconstituées (176).

Un autre modèle de superstructure a été proposé : il s'agit du modèle du "solénoïde continu" (45) ou modèle en "super-hélice".

Les observations de microscopie électronique qui ont conduit à ce modèle décrivent une fibre chromatinienne grossièrement cylindrique qui est en réalité un solénoïde de 250 à 300 Å de diamètre et de 110 Å de pas (37, 45, 123).

Cette fibre peut être convertie, de façon réversible, en fibre de 100 Å, par abaissement de la force ionique (45,123). Lors de cette conversion apparaît une structure intermédiaire, visible en microscopie électronique (145). Ces différentes observations ont amené THOMA et coll. (146) à proposer un modèle dynamique de fibre hélicoïdale que nous reproduisons dans la figure 8. Ce modèle est tiré d'observations de microscopie électronique sur des polynucléosomes pontés par le glutaraldéhyde.

A faible force ionique, on peut observer la fibre de 100 Å de diamètre dans laquelle les nucléosomes sont séparés par le DNA "linker". Il est à noter qu'en l'absence de l'histone H1, le DNA internucléosomique "entre et sort" de la "core-particle" en des points diamétralement opposés. L'adjonction de l'histone H1 provoque un rapprochement des nucléosomes, le DNA "entrant et sortant" de ces particules en un même point. L'augmentation de force ionique amène les nucléosomes au contact l'un de l'autre en une structure plane dite "structure zig-zag". Cet agencement est modifié, lorsqu'on élève la force ionique, pour former les structures hélicoïdales intermédiaires d'environ 250 Å de diamètre et possédant de 3 à 6 nucléosomes par tour.



NUCLEOSOME (Chromatosome)
MINIMUM
166 pb + core histones + H1

pb = paire de bases de DNA
n = nombre de nucléosomes par tour de spire

FIGURE 8 Modèle dynamique du solénoïde de 300 Å de diamètre

Selon THOMA et coll. (1979)
J.Cell.Biology, 83, 403-407.



Ces résultats concordent avec ceux obtenus par différentes méthodes physiques, en particulier la technique de diffusion de la lumière (22).

L'obtention de "superbeads" (121) aussi bien que du "solénoïde continu" (45) nécessitent la présence de l'histone H1.

Les deux modèles présentés ici s'accordent en outre à reconnaître

- d'une part l'existence de la fibre de 100 Å d'épaisseur
- d'autre part l'existence d'une superstructure hélicoïdale de 300 Å de diamètre possédant 6 à 8 nucléosomes par tour, le tout étant de savoir si celle-ci est continue ("solénoïde continu") ou non ("superbeads").

Il n'est pas impossible que les deux types de superstructures coexistent, il n'est pas non plus impossible qu'elles puissent dériver l'une de l'autre (73, 118, 170).

Tout récemment enfin WORCEL et coll. (171) ont proposé un modèle théorique de la chromatine dans lequel les nucléosomes seraient arrangés de façon à former un ruban à partir duquel la fibre de 300 Å de diamètre pourrait être obtenue par simple torsion. Ce modèle est présenté dans la figure 9.

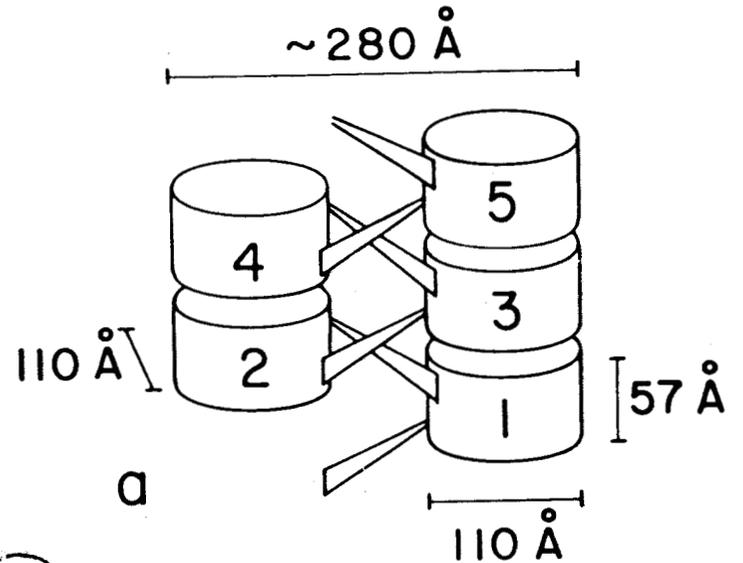


FIGURE 9 a Organisation schématique des nucléosomes en un ruban.

b Modèle tridimensionnel obtenu par torsion du ruban de la figure 9a. Les chiffres noirs représentent le point "d'arrivée" du DNA autour de chaque nucléosome. Les chiffres blancs représentent le DNA "quittant" le nucléosome. Ces 2 chiffres indiquent les points d'interaction DNA-histone H1. Le nucléosome numéroté 1 est présenté hors de la structure.

selon WORCEL, A., STROGATZ, S. and RILEY, D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1461-1465.

b



IV - IMPORTANCE DE L'HISTONE H1 DANS LA STRUCTURE
ET L'ACTIVITE DE LA CHROMATINE

Nous avons pu voir dans la définition du nucléosome (p.30) que cette particule contient une molécule d'histone H1 (ou H5) située en position externe (7, 130), proche de l'histone H2A (16, 18, 66) et de l'histone H3 (122) et liée à 10 paires de bases de DNA de part et d'autre du DNA de la "core-particle" (130) encore que ce dernier fait soit parfois contesté (66).

L'histone H1 sert alors de "verrou" aux deux tours de DNA enroulés autour du noyau protéique constitué par l'octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4 (3).

Récemment des expériences de pontage DNA-histones ont permis de préciser la position de cette histone sur le DNA (10).

La zone globulaire (résidus 36 à 121) est liée fortement, comme cela avait déjà été montré (3, 18, 60, 146) aux extrémités du DNA nucléosomique. Un deuxième type de liaison H1-DNA, plus faible, est mis en évidence tout le long du DNA nucléosomique non lié aux histones de la "core-particle" (10, 66). Les régions NH₂- et COOH-terminales de H1, non structurées, sont impliquées dans cette interaction et pourraient couvrir à peu près 400 Å du DNA nucléosomique (10) ainsi que le montre la figure 10. Ces éléments récents viennent résoudre les problèmes posés par la position de l'histone H1 dans les structures d'ordre supérieur.

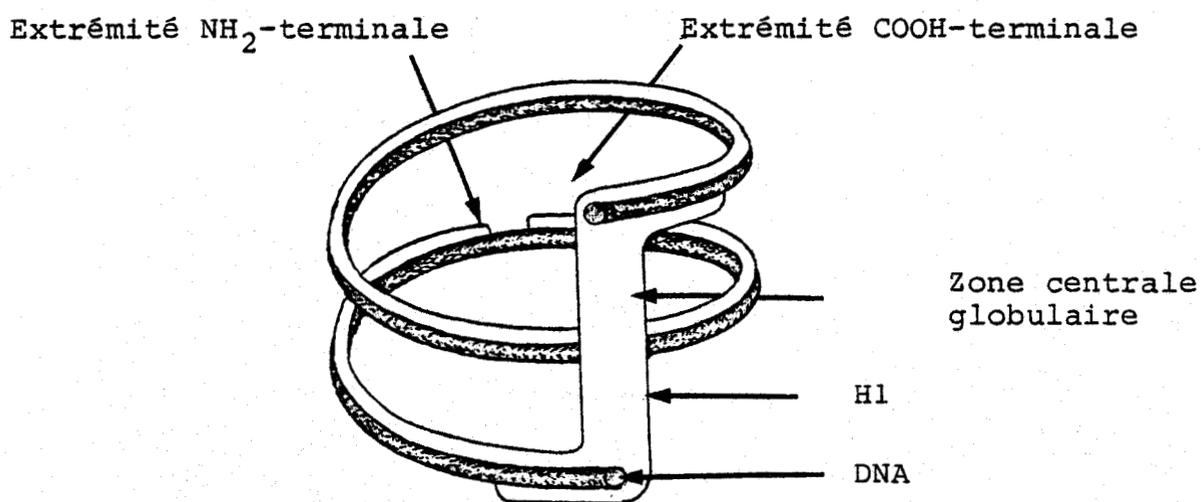


FIGURE 10 Modèle proposé pour l'arrangement, le long du DNA nucléosomique, des différentes zones structurales de l'histone H1.

Selon MIRZABEKOV, A.D. (1980)
Quarterly Review of Biophysics, 13, 255-295.



En effet, dans le modèle du "solénoïde continu" l'histone H1 se situerait dans la lumière du cylindre formé par la super-hélice. Ceci est en accord avec certaines études immunologiques (143) mais il faut toutefois tenir compte du fait que l'histone H1 est la plus sensible à la protéolyse ce qui semblait jusqu'à présent indiquer que cette histone occupe une position "en surface" dans la chromatine.

De plus, il a été montré récemment que la fibre super-hélicoïdale pouvait avoir en réalité un diamètre de 400 Å plutôt que 300 Å (79) ce qui rend plus plausible l'accumulation de molécules d'histone H1 dans la lumière du solénoïde.

En effet des homopolymères de l'histone H1 seraient responsables du maintien de la structure solénoïdale (146, 147). Malgré la très faible tendance à l'agrégation des histones très riches en lysine (137), de tels polymères ont pu être fixés par le glutaraldéhyde (26, 110). Récemment l'utilisation de bis-imidoesters (150) a permis de montrer que deux types de contacts semblent exister entre les différentes molécules de H1 : un contact latéral majeur qui peut refléter l'interaction entre les molécules d'histones H1 de 2 nucléosomes adjacents dans un même tour de super-hélice ; un contact vertical supplémentaire entre les H1 de 2 tours successifs.

Il est à noter enfin que des oligonucléosomes (3 à 20 nucléosomes) s'assemblent spontanément par l'intermédiaire de leurs histones très riches en lysine pour former des structures globulaires de 300 Å de diamètre (69).

Une autre possibilité d'assemblage des nucléosomes résiderait dans la capacité que possèdent les extrémités NH_2 - et COOH -terminales de l'histone H1, de se lier au DNA nucléosomique. Dans ce cas l'histone H1 d'un nucléosome donné pourrait se lier aux nucléosomes adjacents par ses extrémités libres (99).

Les autres histones joueraient aussi un rôle important dans les interactions entre nucléosomes ainsi que l'ont montré les études sur les modifications post-synthétiques (4, 25).

Ainsi l'hyperacétylation de la partie NH_2 -terminale basique des histones de la core-particle déstabiliserait la fibre de 300 Å pour donner des structures plus étendues et transcriptionnellement actives. Cette acétylation poussée est inversement proportionnelle à la phosphorylation de l'histone H1 qui, elle, conduit à l'étape ultime de condensation de la chromatine : le chromosome métaphasique (25).

L'ADP-ribosylation de l'histone H1 semble, pour sa part, augmenter l'interaction de cette histone avec le DNA (117) et même l'interaction des H1 entre elles puisque des complexes ont pu être formés dans lesquels la chaîne de poly-(ADP-ribose) réalise un lien entre deux molécules d'histone H1 (105).

Il nous faut rappeler que les sites d'ADP-ribosylation de l'histone H1 sont précisément situés dans les régions NH_2 - et COOH -terminales de cette protéine (107, 108).

Une autre explication possible de l'influence de l'histone H1 dans la formation et la stabilisation des structures

d'ordre supérieur a été évoquée récemment par BELMONT et NICOLINI (9). Dans ce travail, les auteurs suggèrent que la neutralisation des groupements phosphate du DNA par l'histone H1 suffirait à courber le DNA, le rayon de courbure étant en outre parfaitement dépendant de la force ionique. Le modèle théorique présenté par ces auteurs semble en parfait agrément avec le modèle expérimental de THOMA et coll. (146).

Quels que soient les processus d'assemblage des structures et superstructures de la chromatine l'histone H1 y intervient de façon active et ce rôle multifonctionnel dans les transitions structurales de la chromatine permet de penser que l'histone H1 participe à la régulation de l'expression du génome (99).

En effet l'utilisation de diverses nucléases a permis de mettre en évidence une différence structurale entre chromatine transcriptionnellement active et chromatine inactive (49, 158, 161).

Cette différence sembla tout d'abord liée à la présence ou à l'absence de nucléosomes sur le DNA (91) mais la majorité des auteurs s'accorde maintenant à reconnaître l'existence de structures nucléosomiques tout le long du DNA. Il semblerait toutefois que les nucléosomes soient différents. Certains auteurs ont attribué cette différence entre nucléosomes à l'acétylation des histones (5, 83, 131) ou encore à un changement de composition du nucléosome et en particulier à la présence de protéines HMG (83, 163). Les HMG 14 et HMG 17 se lieraient à

la "core-particle" (2, 93) et les HMG 1 et HMG 2, dont nous avons vu qu'elles se lient au DNA (174), viendraient se substituer à l'histone H1 sur le DNA nucléosomique (83).

Ceci signifierait que la chromatine active se caractérise par des particules nucléosomiques contenant des histones acétylées, des protéines HMG et probablement pas (99) ou peu (126) d'histone H1 ; celle-ci étant alors très faiblement liée au DNA.

Plusieurs modes de transitions structurales ont été proposés pour les nucléosomes de la chromatine transcrite

- Le glissement de l'octamère d'histone le long du DNA. Celui-ci semble possible à une force ionique physiologique et en l'absence de l'histone H1 (139, 164).

- L'ouverture du nucléosome en deux demi-nucléosomes (59, 113) contenant chacun un tétramère H3-H4-H2A-H2B (160, 162). Ce mécanisme exclut, une fois encore, l'histone H1.

Lors de ces transitions dynamiques, l'histone H1, stabilisatrice de la structure nucléosomique pourrait être remplacée par les protéines HMG 1 et HMG 2 (83) dont il a été montré récemment qu'elles sont indispensables à la transcription (140).

Il apparaît de plus en plus évident que l'un des mécanismes régulateurs de l'expression génétique et de la différenciation cellulaire est la reconnaissance de séquences spécifiques du DNA par les nucléosomes, autrement dit le "phasing".

L'existence d'un tel mécanisme a longtemps été contestée. Mais de nombreux auteurs ont montré que la distribution des nucléosomes ne s'effectuait pas au hasard le long du DNA (64, 88, 169) et même que les nucléosomes peuvent avoir une position

bien définie par rapport à la séquence du DNA (27). Les mêmes auteurs ont, un peu plus tard (28) montré que ce "phasing" permettait de mettre en évidence, à l'extérieur du nucléosome, des sites de régulation du DNA. Toujours lors de cette même étude (29) une hypothèse a été émise selon laquelle ce positionnement des structures nucléosomiques ne serait pas un phénomène statique mais un phénomène dynamique qui par "glissement" ou modification de structure du nucléosome masquerait ou démasquerait les séquences régulatrices du DNA (29, 88). Un modèle a été décrit par HELENE (61) qui fait ainsi la revue de toutes les données actuelles et, entre autres, des particularités de structure secondaire du DNA marquant le début ou la fin des zones de "phasing".

Un point reste toutefois obscur : quel est le mécanisme qui permet aux nucléosomes "phasés" de conserver leur place les uns par rapport aux autres ? Ceci pourrait être le rôle dévolu à l'une des protéines chromatiniennes extérieures à la "core-particle" (non-histones ou histones H1) qui pourrait reconnaître certaines séquences spécifiques du DNA (39).

V - ROLE DES DIFFERENTS TYPES D'HISTONE H1

L'histone H1, comme nous l'avons déjà dit, est en réalité une famille de protéines de structures assez peu différentes et présentant comme point commun un domaine globulaire assez conservé (3) et deux extrémités basiques, variables d'une espèce à l'autre, communément appelées dans la littérature le "nez" (zone NH₂-terminale) et la "queue" (zone COOH-terminale) de l'histone H1.

Si le rôle de la partie globulaire est en partie élucidé (3, 132), son mode d'interaction avec le DNA est encore sujet à controverse (81), bien que sa zone d'interaction avec l'acide nucléique soit parfaitement localisée (10).

En ce qui concerne l'extrémité NH₂-terminale très variable suivant les espèces (120) et l'extrémité COOH-terminale, tout aussi variable, et qui contient la quasi totalité des résidus de lysine, alanine et proline de la molécule (32), on ne connaît que très peu de choses quant à leur rôle.

Elles semblent impliquées dans une interaction mineure avec le DNA nucléosomique (10) mais des travaux récents indiquent qu'elles seraient responsables d'un contrôle de la structure secondaire de la zone globulaire (8). Nous devons rappeler ici que ces zones très basiques de la molécule sont le siège des principales modifications post-synthétiques (57, 58, 108).

La présence dans l'érythrocyte nucléé d'une histone spécifique, l'histone H5, dont la zone centrale globulaire

ressemble à celle des histones H1, semble impliquer que les extrémités basiques de cette molécule ont un rôle particulier d'inhibiteur de l'expression génique.

L'histone H1° (BEP,IP25), décrite pour la première fois par PANYIM et CHALKLEY en 1969 (114) a été mise en évidence dans la plupart des cellules somatiques de mammifères (94,114) et dans un grand nombre de cellules modifiées (36, 72, 115) dont la caractéristique commune est de n'être pas en division.

Ceci rapproche l'histone H1° de l'histone H5 dont elle pourrait assurer les fonctions mais dans le noyau des cellules de mammifères. Cette ressemblance fonctionnelle est renforcée par une grande ressemblance structurale (24, 102, 116).

L'existence de ces deux histones, de type H1, ainsi que la grande diversité des sous-fractions d'histone H1 au sein d'une même cellule pose le problème du rôle particulier de chacun de ces composants. On aurait pu croire à l'existence de simples variants structuraux sans signification fonctionnelle mais l'apparition dans la chromatine des sous-espèces d'histone H1 semble être liée au déroulement du cycle cellulaire (133).

De plus il est certain que certaines sous-fractions sont beaucoup plus représentées, voire spécifiques de certaines cellules d'un même organisme.

Enfin, les cellules transformées présentent une "panoplie" de sous-fractions d'histone H1 différente de celle de la cellule originelle (144).

Ces arguments tendent à affirmer la différence fonctionnelle issue de la différence structurale entre les divers sous-types d'histone H1. Des travaux récents ont permis d'établir que les sous-fractions d'histone H1 n'avaient pas le même pouvoir de protection (56) et d'organisation du DNA (85, 86, 87).

Il apparaît de plus en plus nécessaire à l'heure actuelle de considérer l'histone H1, non comme une seule entité présentant des variants, mais bien comme une famille protéique dont chacun des membres possède une originalité fonctionnelle et joue un rôle important dans la structure et/ou le métabolisme de la chromatine.

Or, nous disposons d'un modèle intéressant ; le noyau d'érythrocyte de Poulet, qui contient l'histone spécifique H5 que nous pouvons considérer comme une histone H1 "extrême".

La structure primaire de l'histone H5 a été déterminée dans notre laboratoire alors que nous n'avons que très peu d'informations sur l'histone H1. La seule information que l'on connaisse concerne une sous-fraction - C.E.L.5 - (Chicken Erythrocyte Lysine rich histone - sous-fraction 5) dont COLE (32) a proposé quelques éléments de structure primaire en comparant l'hydrolysate tryptique de cette sous-fraction avec la séquence en acides aminés de la sous-fraction 3 de thymus de Lapin (RTL-3).

Nous avons donc été amenés à envisager une étude approfondie de l'histone H1 de Poulet. Cette étude implique la

séparation et la caractérisation des différentes sous-fractions. Les différences fonctionnelles entre ces protéines ne pouvant s'expliquer que par des différences structurales, la détermination de la structure primaire de ces molécules sera un élément fondamental pour la compréhension de leur fonction. Ces études structurales nous permettront en outre d'éclairer le mécanisme de la mise en "dormance" du noyau par l'histone H5 et d'établir une filiation entre cette protéine et l'histone H1.

BIBLIOGRAPHIE DE LA PREMIERE PARTIE

- | | Pages |
|--|------------|
| <p>1 - ALBRIGHT, S.C., NELSON, P.P. and GARRARD, W.T. (1979)</p> <p style="padding-left: 40px;">Histone molar ratios among different electrophoretic forms of mono- and dinucleosomes.
<u>J. Biol. Chem.</u>, <u>254</u>, 1065-1073.</p> | 30 |
| <p>2 - ALBRIGHT, S.C., WISEMAN, J.M., LANGE, R.A. and GARRARD, W.T. (1980)</p> <p style="padding-left: 40px;">Subunit structures of different electrophoretic forms of nucleosomes.
<u>J. Biol. Chem.</u>, <u>255</u>, 3673-3684.</p> | 30, 41 |
| <p>3 - ALLAN, J., HARTMAN, P.G., CRANE-ROBINSON, C. and AVILES, F.X. (1980)</p> <p style="padding-left: 40px;">The structure of histone H1 and its location in chromatin.
<u>Nature</u>, <u>288</u>, 675-679.</p> | 28, 36, 43 |
| <p>4 - ALLAN, J., HARBORNE, N., RAU, D.C. and GOULD, H. (1982)</p> <p style="padding-left: 40px;">Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid.
<u>J. Cell Biol.</u>, <u>93</u>, 285-297.</p> | 22, 39 |
| <p>5 - ALLFREY, V.G. (1977)</p> <p style="padding-left: 40px;">Post-synthetic modifications of histone structure.
in <u>Chromatin and chromosome structure</u>, 167-192 (Ed. LI, H.J. and ECKHARDT, R.A., N.Y. Academic Press)</p> | 9, 40 |
| <p>6 - BAKAYEV, V.V., BAKAYEVA, T.G., SCHATCHENKO, V.V. and GEORGIEV, G.P. (1978)</p> <p style="padding-left: 40px;">Non-histone proteins in mononucleosomes and subnucleosomes.
<u>Eur. J. Biochem.</u>, <u>91</u>, 291-301.</p> | 30 |

- 7 - BALDWIN, J.P., BOSELEY, P.G., BRADBURY, E.M. and IBEL, K. (1975) 18, 19, 28, 36
 The subunit structure of the eucaryotic chromosome.
Nature, 253, 245-249.
- 8 - BARBERO, J.L., FRANCO, L. and MONTERO, F. (1982) 28, 43
 Influence of the N- and C-terminal tails on the structure of the globular head of histone H1.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 842-847.
- 9 - BELMONT, A. and NICOLINI, C. (1981) 40
 Polyelectrolyte theory and chromatin-DNA quaternary structure : role of ionic strength and H1 histone.
J. Theor. Biol., 90, 169-179.
- 10 - BELYAVSKY, A.V., BAVYKIN, S.G., GOGUADZE, E.G. and MIRZABEKOV, A.D. (1980) 36, 43
 Primary organization of nucleosomes containing all five histones and DNA.
J. Mol. Biol., 139, 519-536.
- 11 - BENTLEY, G.A., FINCH, J.T. and LEWIT-BENTLEY, A. (1981) 19
 Neutron diffraction studies on crystals of nucleosome cores using contrast variation.
J. Mol. Biol., 145, 771-784.
- 12 - BÖHM, L., HAYASHI, H., CARY, P.D., MOSS, T., CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1977) 15
 Sites of histone, histone interaction in the H3-H4 complex.
Eur. J. Biochem., 77, 487-493.
- 13 - BÖHM, L., CRANE-ROBINSON, C. and SAUTIERE, P. (1980) 16
 Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure identification of a limit peptide of histone H2A.
Eur. J. Biochem., 106, 525-530.

- 14 - BÖHM, L., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and CRANE-ROBINSON, C. (1981) 15
 Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of the limit peptides of histones H3 and H4. Eur.J.Biochem., 119, 67-74.
- 15 - BÖHM, L., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and CRANE-ROBINSON, C. (1982) 16
 Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of limit peptides from histone H2B. Eur.J.Biochem., 123, 299-303.
- 16 - BONNER, W.N. and STEDMAN, J.B. (1979) 28,36
 Histone H1 is proximal to histone 2A and to A24. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 2190-2194.
- 17 - BOSELEY, P.G., BRADBURY, E.M., BUTLER-BROWNE, G.S., CARPENTER, B.G. and STEPHENS, R.M. (1976) 21
 Physical studies of chromatin. The recombination of histones with DNA. Eur.J.Biochem., 62, 21-23.
- 18 - BOULIKAS, T., WISEMAN, J.M. and GARRARD, W.T. (1980) 28,36
 Points of contact between histone H1 and the histone octamer. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77, 127-131.
- 19 - BRADBURY, E.M., MOSS, T., HAYASHI, H., HJELM, R.P., SUAU, P., STEPHENS, R.M., BALDWIN, J.P. and CRANE-ROBINSON, C. (1977) 15
 Nucleosomes, histone interactions and the role of histones H3 and H4. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 42, 277-286.
- 20 - BRIAND, G., KMIETEK, D., SAUTIERE, P., WOUTERS, D., BORIE-LOY, O., BISERTE, G., MAZEN, A. CHAMPAGNE, M. (1980) 6
 Chicken erythrocyte histone H5.IV Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence. FEBS Letters, 112, 147-151.

- 21 - BYVOET, P. and BAXTER, C.S. (1975) 11
In Chromosomal proteins and their role in the regulation of gene expression., 127-151
 (Ed. STEIN, G.S. and KLEINSMITH, L.J. New-York Academic Press)
- 22 - CAMPBELL, A.M., COTTER, R.I. and PARDON, J.F. (1978) 34
 Light scattering measurements supporting helical structures for chromatin in solution.
Nucleic Acids Research, 5, 1571-1580.
- 23 - CARTER, C.W. Jr, LEVINGER, L.F. and BIRINYI, F. (1980) 24
 Dimeric histone interactions and histone packing.
J. Biol. Chem., 255, 748-754.
- 24 - CARY, P.D., HINES, M.L., BRADBURY, E.M., SMITH, B.J. and JOHNS, E.W. (1981) 44
 Conformational studies of histone H1^o in comparison with histones H1 and H5.
Eur. J. Biochem., 120, 371-377.
- 25 - CHAHAL, S.S., MATTHEWS, H.R. and BRADBURY, E.M. (1980) 10, 39
 Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function.
Nature, 287, 76-79.
- 26 - CHALKLEY, R. and HUNTER, C. (1980) 38
 Histone-histone propinquity by aldehyde fixation of chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1304-1308.
- 27 - CHAO, M.V., GRALLA, J. and MARTINSON, H.G. (1979) 42
 DNA sequence direct placement of histone cores on restriction fragments during nucleosome formation.
Biochemistry, 18, 1068-1074.
- 28 - CHAO, M.V., GRALLA, J.D. and MARTINSON, H.G. (1980) 42
 Lac operator nucleosomes I - Repressor binds specifically to operator within the nucleosome core.
Biochemistry, 19, 3260-3269.

- 29 - CHAO, M.V., MARTINSON, H.G. and GRALLA, J.D. (1980) 42
Lac operator nucleosomes 2 - Lac nucleosomes can change conformation to strengthen binding by lac repressor.
Biochemistry, 19, 3260-3269.
- 30 - CHATTERJEE, S. and WALKER, J.O. (1973) 27
The modification of deoxyribonucleohistone by trypsin and chymotrypsin.
Eur.J.Biochem., 34, 519-534.
- 31 - CHOU, P.Y. and FASMAN, G.D. (1974) 13
Conformational parameters for amino acids in helical, β sheet and random coil regions calculated from proteins.
Biochemistry, 13, 211-221.
- 32 - COLE, R.D. (1977) 6, 43, 45
Special features of the structures of H1 histones.
in The molecular biology of the mammalian genetic apparatus, 1, 93-104. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New-York, Oxford.
- 33 - COUSENS, L.S., GALLWITZ, D. and ALBERTS, B.M. (1979) 13
Different accessibilities in chromatin to histone acetylase.
J.Biol.Chem., 254, 1716-1723.
- 34 - COWMAN, M.K. and FASMAN, G.D. (1980) 28
Dependance of mononucleosome deoxyribonucleic acid conformation on the deoxyribonucleic acid length and H1/H5 content circular dichroism and thermal denaturation studies.
Biochemistry, 19, 532-541.
- 35 - D'ANNA, J.A. and ISENBERG, G.I. (1974) 15
A histone cross-complexing pattern.
Biochemistry, 13, 4992-4997.

- 36 - D'ANNA, J.A., GURLEY, L.R., BECKER, R.R., BARHAM, S.S., TOBEY, R.A. and WALTERS, R.A. (1980) 44
Amino acid analysis and cell cycle dependent phosphorylation of an H1-like, butyrate-enhanced protein (BEP; H1^o; IP25) from chinese Hamster cells.
Biochemistry, 19, 4331-4341.
- 37 - DAVIES, H.G. (1968) 32
Electron-microscope observations on the organization of heterochromatin in certain cells.
J.Cell.Sci., 3, 129-150.
- 38 - DEFER, N., KITZIS, A., LEVY, F., TICHONICKY, L., SABATIER, M.M. and KRUEH, J. (1978) 30
Presence of non-histone proteins in nucleosomes.
Eur.J.Biochem., 88, 583-591.
- 39 - DIEZ-CABALLERO, T., AVILES, F.X. and ALBERT, A. (1981) 42
Specific interaction of histone H1 with eukaryotic DNA.
Nucleic Acids Research, 9, 1383-1393.
- 40 - DIXON, G.H., CANDIDO, E.P.M., LOUIE, A.J., MACLEOD, A.R. and SONG, M.T. (1975) 9,11
Ciba Found.Symposium, 28, 229-258.
- 41 - DOUVAS, A.S., HARRINGTON, C.A. and BONNER, J. (1975) 2
Major non-histone protein of rat liver chromatin: preliminary identification of myosin, actin, tubulin and tropomyosin.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 3902-3906.
- 42 - DUERRE, J.A., WALLWORK, J.C., QUICK, D.P. and FORD, K.M. (1977) 13
In vitro studies on the methylation of histones in rat brain nuclei.
J.Biol.Chem., 252, 5981-5985.

- 43 - EICKBUSH, T.E. and MOUDRIANAKIS, E.M. (1978) 21
 The histone core complex: An octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.
Biochemistry, 23, 4955-4964.
- 44 - ELGIN, S.C.R. and BONNER, J. (1973) 2
 in The biochemistry of gene expression in higher organisms, 142-163. Eds POLLACK, J.K. and LEE, J.W.
- 45 - FINCH, J.T. and KLUG, A. (1976) 31, 32, 34
 Solenoidal model for superstructure in chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1897-1901.
- 46 - FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUSHTON, B., LEVITT, M. and KLUG, A. (1977) 19, 22
 Structure of nucleosome core particle of chromatin.
Nature, 269, 29-36.
- 47 - FINCH, J.T., BROWN, R.S., RHODES, D., RICHMOND, T., RUSHTON, B., LUTTER, L.C. and KLUG, A. (1981) 22
 X-ray diffraction study of a new crystal form of the nucleosome core showing higher resolution.
J. Mol. Biol., 145, 751-769.
- 48 - GERSHEY, Y.E.L., HASLETT, G.W., VIDALI, G. and ALLFREY, V.G. (1969) 11
 Chemical studies of histone methylation. Evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone fractions.
J. Biol. Chem., 244, 4871-4877.
- 49 - GLOVER, C.V.C. and GOROVSKY, M.A. (1978) 40
 Histone-histone interactions in a lower eukariote *Tetrahymena thermophila*.
Biochemistry, 17, 5705-5713.

- 50 - GOLDKNOPF, I.L., TAYLOR, C.W., BAUM, R.M., YEOMAN, L.C., OLSON, O.J., PRESTAYKO, A.W. and BUSCH, H. (1975) 12
Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein.
J. Biol. Chem., 250, 7182-7187.
- 51 - GOLDKNOPF, I.L. and BUSCH, H. (1977) 12
Isopeptide linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 864-868.
- 52 - GOLDKNOPF, I.L., WILSON, G., BALLAL, N.R. and BUSCH, H. (1980) 13
Chromatin conjugate protein A24 is cleaved and ubiquitin is lost during chicken erythropoiesis.
J. Biol. Chem., 255, 10555-10558.
- 53 - GOODWIN, G.M. and JOHNS, E.W. (1973) 3
Isolation and characterization of two calf thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids.
Eur. J. Biochem., 40, 215-219.
- 54 - GOODWIN, G.M., NICOLAS, R.H. and JOHNS, E.W. (1975) 3
An improved large scale fractionation of high mobility group non-histone chromatin proteins.
Biochim. Biophys. Acta, 405, 280-291.
- 55 - GOODWIN, G.M., WOODHEAD, L. and JOHNS, E.W. (1977) 30
The presence of high mobility group non-histone chromatin proteins in isolated nucleosomes.
FEBS Letters, 73, 85-88.
- 56 - GORKA, C. and LAWRENCE, J.J. (1979) 45
The distribution of histone H1 subfractions in chromatin subunits.
Nucleic Acids Research, 7, 347-359.

- 57 - GURLEY, L.R., D'ANNA, J.A., BARHAM, S.S., DEAVEN, L.L. and TOBEY, R.A. (1978) 10,13,43
 Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in chinese Hamster cells.
Eur.J.Biochem., 84, 1-15.
- 58 - GURLEY, L.R., WALTERS, R.A., BARHAM, S.S. and DEAVEN, L.L. (1978) 10,43
 Heterochromatin and histone phosphorylation.
Exp.Cell.Res., 11, 373-383.
- 59 - HARRINGTON, R.E. (1981) 41
 Structural conformations of nucleosomes at low ionic strength from flow birefringence and intrinsic viscosity.
Biopolymers, 20, 719-752.
- 60 - HARTMAN, P.G., CHAPMAN, G.E., MOSS, T. and BRADBURY, E.M. (1977) 36
 Studies on the role and mode of operation of the very lysine rich histone H1 in eukaryote chromatin.
Eur.J.Biochem., 77, 45-51.
- 61 - HELENE, C. (1981) 42
 Recognition of base sequences by regulatory proteins in procaryotes and eucaryotes.
Bioscience Reports, 1, 477-483.
- 62 - HEWISH, D.R. and BURGOYNE, L.A. (1973) 17
 Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 52, 504
- 63 - HOZIER, J., RENZ, M. and NEHLS, P. (1977) 31
 The chromosome fiber: Evidence for an ordered superstructure of nucleosomes.
Chromosoma, 62, 301-317.

- 64 - IGO-KEMENES, T., OMORI, A. and ZACHAU, H.G. (1980) 41
 Non-random arrangement of nucleosomes in satellite I containing chromatin of rat liver.
Nucleic Acids Research, 22, 5377-5390.
- 65 - ISACKSON, P.J., CLOW, L.G. and REECK, G.R. (1981) 30
 Comparison of the salt-dissociations of high molecular weight HMG non-histone chromatin proteins from double-stranded DNA and from chromatin.
FEBS Letters, 125, 30-34.
- 66 - ISHIMI, Y., OHBA, Y., YASUDA, H. and YAMADA, M. (1981) 28, 36
 The interaction of H1 histone with nucleosome core.
J. Biochem., 89, 1881-1888.
- 67 - JAVAHERIAN, K., LIU, L.F. and WANG, J.C. (1978) 3
 Non-histone proteins HMG 1 and HMG 2 change the DNA helical structure.
Science, 199, 1345-1346.
- 68 - JONES, G.M.T., RALL, S.C. and COLE, R.D. (1974) 6, 28
 Extension of the amino acid sequence of a lysine-rich histone.
J. Biol. Chem., 249, 2548-2553.
- 69 - JORCANO, J.L., MEYER, G., DAY, L.A. and RENZ, M. (1980) 38
 Aggregation of small oligonucleosomal chains into 300-Å globular particles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 6443-6447.
- 70 - KEICHLIN, L.D. and WASSARMAN, P.M. (1977) 18
 Developmental study of the structure of sea urchin embryo and sperm chromatin using micrococcal nuclease.
Biochim. Biophys. Acta, 475, 139-151.
- 71 - KELLEY, R.I. (1973) 14
 Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1588-1594.

- 72 - KEPPEL, F., ALLET, B. and EISEN, H. (1977) 44
Appearance of a chromatin protein during
the erythroid differentiation of friend
virus-transformed cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 653-656.
- 73 - KIRYANOV, G.I., SMIRNOVA, T.A. and POLYAKOV, V.Y. 34
(1982)
Nucleomeric organization of chromatin.
Eur.J.Biochem., 124, 331-338.
- 74 - KLUG, A., RHODES, D., SMITH, J. and THOMAS, J.O. 22,24
(1980)
A low resolution structure for the histone
core of the nucleosome.
Nature, 287, 509-516.
- 75 - KORNBERG, R.D. and THOMAS, J.O. (1974) 14
Chromatin structure : oligomers of the
histones.
Science, 184, 865-868.
- 76 - KORNBERG, R.D. (1974) 18
Chromatin structure : a repeating unit of
histone and DNA chromatin structure is
based on a repeating unit of eight histone
molecule and about 200 DNA base pairs.
Science, 184, 868-871.
- 77 - KORNBERG, R.D. (1977) 18
Structure of chromatin.
Ann.Rev.Biochem., 46, 931-954.
- 78 - LANGMORE, J.P. and WOOLEY, J.C. (1975) 22
Chromatin architecture : investigation of
a subunit of chromatin by dark field elec-
tron microscopy.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 2691-2695.
- 79 - LANGMORE, J.P. and SCHUTT, C. (1980) 38
The higher order structure of chicken
erythrocyte chromosomes *in vivo*.
Nature, 288, 620-622.

- 80 - LASKEY, R.A. and EARNSHAW, W.C. (1980) 3
 Nucleosome assembly.
Nature, 286, 763-767.
- 81 - LAWRENCE, J.J., BERNE, L., OUVRIER-BUFFET, J.L. and PIETTE, L.H. (1980) 43
 Spin-label study of histone H1-DNA interaction. Comparative properties of the central part of the molecule and the N- and C-amino tails.
Eur.J.Biochem., 107, 263-269.
- 82 - LEVY-WILSON, B. and DIXON, G.H. (1979) 30
 Limited action of micrococcal nuclease on trout testis nuclei generates 2. nucleosome subsets enriched in transcribed DNA sequences.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 76, 1682-1686.
- 83 - LEVY-WILSON, B., WATSON, D.C. and DIXON, G.H. (1979) 40,41
 Multi-acetylated forms of H4 are found in a putative transcriptionally competent chromatin fraction from trout testis.
Nucleic Acids Research, 6, 259-274.
- 84 - LEWIS, P.N., BRADBURY, E.M. and CRANE-ROBINSON, C. (1975) 14
 Ionic strength induced structure in histone H4 and its fragments.
Biochemistry, 14, 3391-3400.
- 85 - LIAO, L.W. and COLE, R.D. (1981) 45
 Differences among subfractions of H1 histone in their interactions with linear and super-helical DNA.
J.Biol.Chem., 256, 6751-6755.
- 86 - LIAO, L.W. and COLE, R.D. (1981) 45
 Condensation of dinucleosomes by individual subfractions of H1 histones.
J.Biol.Chem., 256, 10124-10129.

- 87 - LIAO, L.W. and COLE, R.D. (1981) 45
 Differences among H1 histone subfractions in binding to linear and superhelical DNA.
J.Biol.Chem., 256, 11145-11150.
- 88 - LOUIS, C., SCHEDL, P., SAMAL, B. and WORCEL, A. (1980) 41, 42
 Chromatin structure of the 5S RNA genes of *D.melanogaster*.
Cell, 22, 387-392.
- 89 - LUTTER, L.C. (1978) 21
 Kinetic analysis of deoxyribonuclease I cleavages in the nucleosome core : evidence for a DNA superhelix.
J.Mol.Biol., 124, 391-420.
- 90 - LUZZATI, V. and NICOLAÏEFF, A. (1963) 17
 The structure of nucleohistones and nucleoprotamines.
J.Mol.Biol., 7, 142-163.
- 91 - MAC KNIGHT, S.L. and MILLER, O.L. Jr (1976) 40
 Ultrastructural patterns of RNA-synthesis during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*.
Cell, 8, 305-319.
- 92 - MACLEOD, A.R., WONG, N.C. and DIXON, G.H. (1977) 4, 6
 The amino acid sequence of trout testis histone H1.
Eur.J.Biochem., 78, 281
- 93 - MARDIAN, J.K.W., PATON, A.E., BUNICK, G.J. and OLINS, D.E. (1980) 30, 41
 Nucleosome cores have two specific binding sites for non-histone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17.
Science, 209, 1534-1536.
- 94 - MARKS, D.B., KANEFSKY, T., KELLER, B.J. and MARKS, A.D. 44 (1975)
 The presence of histone H1^o in human tissues.
Cancer Res., 35, 886-889.

- 95 - MARTINSON, H.G., TRUE, R., LAU, C.K. and MEHRABIAN, M. (1979) 24
 Histone-histone interactions within chromatin. Preliminary location of multiple contact sites between histones 2A, 2B and 4. Biochemistry, 18, 1075-1082.
- 96 - MARTINSON, H.G. and TRUE, R.J. (1979) 24
 Amino acid contacts between histones are the same for plants and mammals. Binding-site studies using ultraviolet light and tetranitromethane. Biochemistry, 18, 1947-1951.
- 97 - MATHIS, D.J., OUDET, P., WASYLYK, B. and CHAMBON, P. (1978) 10
 Effect of histone acetylation on structure and *in vitro* transcription of chromatin. Nucleic Acids Research, 5, 3523-3547.
- 98 - MIRZABEKOV, A.D., SHICK, V.V., BELYAVSKY, A.V. and BAVYKIN, S.G. (1978) 24
 Primary organization of nucleosome core particle of chromatin sequence of histone arrangement along DNA (crosslinking of proteins to DNA/sequencing). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4184-4188.
- 99 - MIRZABEKOV, A.D. (1980) 39, 40, 41
 Nucleosomes structure and its dynamic transitions. Quarterly. Rev. of Biophysics, 13, 255-295.
- 100 - MOSS, T., CARY, P.D., ABERCROMBIE, B.D., CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1976) 15
 A pH-dependant interaction between histones H2A and H2B involving secondary and tertiary folding. Eur. J. Biochem., 71, 337-350.
- 101 - MULLINS, D.N. Jr, GIRI, C.P. and SMULSON, M. (1977) 13
 Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase: the distribution of a chromosome-associated enzyme within the chromatin substructure. Biochemistry, 16, 506-513.

- 102 - MURA,C.V. and STOLLAR,B.D.(1981) 44
 Serological detection of homologies of H1^o
 with H5 and H1 histones.
J.Biol.Chem., 256, 9767-9769.
- 103 - NICOLA,N.A., FULMER,A.W., SHWARTZ,A.M. and 14,31
 FASMAN,G.D.(1978)
 High resolution proton magnetic resonance
 spectroscopy of histones and histone-his-
 tone complexes in aqueous solution.
Biochemistry, 17, 1779-1785.
- 104 - NISHIZUKA,Y., UEDA,K., HONJO,T. and HAYAISHI,O. 11
 (1968)
 Enzymatic adenosine diphosphate ribosylation
 of histone and polyadenosine diphosphate
 ribose synthesis in rat liver nuclei.
J.Biol.Chem., 243, 3765-3767.
- 105 - NOLAN,N.L., BUTT,T.R., WONG,M., LAMBRIANIDOU,A. 39
 and SMULSON,M.E.(1980)
 Characterization of poly(ADP-ribose)-
 histone H1 complex formation in purified
 polynucleosomes and chromatin.
Eur.J.Biochem., 113, 15-25.
- 106 - NOLL,M.(1974) 19
 Internal structure of the chromatin subunit.
Nucleic Acids Research, 1, 1573-1578.
- 107 - OGATA,N., UEDA,K. and HAYAISHI,O.(1980) 12,39
 ADP-ribosylation of histone H2B.
J.Biol.Chem., 255, 7610-7615.
- 108 - OGATA,N., UEDA,K., KAGAMIYAMA,H. and HAYAISHI,O. 12,39,43
 (1980)
 ADP-ribosylation of histone H1.
J.Biol.Chem., 255, 7616-7620.
- 109 - OHLENBUSCH,H.H., OLIVERA,B.M., TUAN,D. and 27
 DAVIDSON,N.(1967)
 Selective dissociation of histones from
 calf thymus nucleoprotein.
J.Mol.Biol., 25, 299-315.

- 110 - OLINS, D.E. and WRIGHT, E.B. (1973) 38
 Glutaraldehyde fixation of isolated eu-
 karyotic nuclei.
J.Cell.Biol., 59, 304-311.
- 111 - OLINS, A.L. and OLINS, D.E. (1974) 18
 Spheroid chromatin units (v bodies)
Science, 183, 330-332.
- 112 - OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1974) 18,27
 Electron microscopic and biochemical evi-
 dence that chromatin structure is a repea-
 ting unit.
Cell, 4, 281-300.
- 113 - OUDET, P., SPADAFORA, C. and CHAMBON, P. (1978) 41
 Nucleosome structure II : structure of the
 SV40 minichromosome and electron microscopic
 evidence for reversible transitions of the
 nucleosome structure.
Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 42,
 301-312.
- 114 - PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969) 44
 High resolution acrylamide gel electropho-
 resis of histones.
Arch.Biochem.Biophys., 130, 337-346.
- 115 - PEHRSON, J. and COLE, R.D. (1980) 44
 Histone H1^o accumulates in growth-inhibi-
 ted cultured cells.
Nature, 285, 43-44.
- 116 - PEHRSON, J.R. and COLE, R.D. (1981) 44
 Bovine H1^o histone subfractions contain
 an invariant sequence which matches histone
 H5 rather than H1.
Biochemistry, 20, 2298-2301.
- 117 - POIRIER, G.G. and SAVARD, P. (1980) 39
 ADP-ribosylation of pancreatic histone H1
 and of other histone.
Can.J.Biochem., 58, 509-515.

- 118 - PRUITT, S.C. and GRAINGER, R.M. (1980) 34
A repeating unit of higher order chromatin structure in chick red blood cell nuclei. Chromosoma, 78, 257-274.
- 119 - PRUNELL, A., KORNBERG, R.D., LUTTER, L.C., KLUG, A., LEVITT, M. and CRICK, P.H.C. (1979) 19
Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin. Science, 204, 855-858.
- 120 - RALL, S.C. and COLE, R.D. (1971) 43
Amino acid sequence and sequence variability of the amino-terminal regions of lysine-rich histones. J. Biol. Chem., 246, 7175-7190.
- 121 - RENZ, M., NEHLS, P. and HOZIER, J. (1977) 31, 34
Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1879-1884.
- 122 - RING, D. and COLE, R.D. (1979) 28, 30, 36
Chemical crosslinking of H1 histone to the nucleosomal histones. J. Biol. Chem., 254, 11688-11695.
- 123 - RIS, H. and KUBAÏ, D.F. (1970) 32
Chromosome structure. Ann. Rev. Genet., 4, 263-294.
- 124 - ROARK, D.E., GEOGHEGAN, T.E. and KELLER, G.H. (1974) 14
A two subunit histone complex from calf thymus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 59, 542-547.
- 125 - SAHASRABUDDHE, C.G. and Van HOLDE, R.E. (1974) 18
The effects of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments. J. Biol. Chem., 249, 152-156.

- 126 - SCHLAEGER, E.J. (1982) 41
 Replicative conformation of parental nucleosomes: salt sensitivity of deoxyribonucleic acid-histone interaction and alteration of histone H1 binding.
Biochemistry, 21, 3167-3174.
- 127 - SEALY, L. and CHALKLEY, R. (1978) 13
 The effect of sodium butyrate on histone modification.
Cell, 14, 115-121.
- 128 - SHICK, V.V., BELYAVSKY, A.V., BAVYKIN, S.G. and MIRZABEKOV, A.D. (1980) 24
 Primary organization of the nucleosome core particles. Sequential arrangement of histones along DNA.
J.Mol.Biol., 139, 491-517.
- 129 - SIMPSON, R.T. and WHITLOCK, J.P. Jr (1976) 21
 Mapping DNase I-susceptible sites in nucleosomes labeled at the 5' ends.
Cell, 9, 347-353.
- 130 - SIMPSON, R.T. (1978) 27, 36
 Structure of chromatin containing extensively acetylated H3 and H4.
Cell, 13, 691-699.
- 131 - SIMPSON, R.T. (1978) 40
 Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones.
Biochemistry, 17, 5524-5531.
- 132 - SINGER, D.S. and SINGER, M.F. (1976) 43
 Studies on interaction of H1 histone with superhelical DNA. Characterization of recognition and binding regions of H1 histone.
Nucleic Acids Research, 3, 2531-2547.

- 133 - SIZEMORE, S.R. and COLE, R.D. (1981) 44
Asynchronous appearance of newly synthesized histone H1 subfractions in Hela chromatin.
J. Cell Biol., 90, 415-417.
- 134 - SKANDRANI, E., MIZON, J., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. 14 (1972)
Etude de la fraction F2b des histones de thymus de Veau.
Biochimie, 54, 1267-1272.
- 135 - SMERDON, M.J. and ISENBERG, I. (1976) 30
Interactions between the subfractions of calf thymus H1 and non-histone chromosomal proteins HMG 1 and HMG 2.
Biochemistry, 15, 4242-4245.
- 136 - SPERLING, R. and BUSTIN, M. (1975) 15
Dynamic equilibrium in histone assembly : self assembly of single histones and histone pairs.
Biochemistry, 14, 3322-3331.
- 137 - SPERLING, R. and BUSTIN, M. (1976) 38
Histone dimers : a fundamental unit in histone assembly.
Nucleic Acids Research, 3, 1263-1275.
- 138 - SPIKER, S. and ISENBERG, I. (1977) 14, 22
Cross-complexing pattern of plant histones.
Biochemistry, 16, 1819-1826.
- 139 - STEINMETZ, M., STREECK, R.E. and ZACHAU, H.G. (1978) 41
Closely spaced nucleosome cores in reconstituted histone. DNA complexes and histone H1-depleted chromatin.
Eur. J. Biochem., 83, 615-628.
- 140 - STOUTE, J.A. and MARZLUFF, W.F. (1982) 41
HMG proteins 1 and 2 are required for transcription of chromatin by endogenous RNA polymerase.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 1279-1284.

- 141 - STRÄTLING, W.H., MÜLLER, U. and ZENTGRAF, H. (1978) 31
 The higher order repeat structure of chromatin is built up of globular particles containing eight nucleosomes.
Exp.Cell.Res., 117, 301-311.
- 142 - STRICKLAND, W.N., STRICKLAND, M., BRANDT, W.F., 4
 VON HOLT, C., LEHMANN, A. and WITTMANN-LIEBOLD, B.
 (1980)
 The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Paracentrotus angulosus*.
 2 Sequence of the C-terminal CNBr peptide and the entire primary structure.
Eur.J.Biochem., 104, 567-578.
- 143 - TAKAHASHI, K. and TASHIRO, Y. (1979) 38
 Binding of antibodies against histone H1 to unfolded and folded nucleofilaments.
Eur.J.Biochem., 97, 353-360.
- 144 - TAN, K.B., BORUN, T.W., CHARPENTIER, R., 44
 CRISTOFALO, V.J. and CROCE, C.M. (1982)
 Normal and neoplastic human cells have different histone H1 compositions.
J.Biol.Chem., 257, 5337-5338.
- 145 - THOMA, F. and KOLLER, Th. (1977) 32
 Influence of histone H1 on chromatin structure.
Cell, 12, 101-107.
- 146 - THOMA, F., KOLLER, Th. and KLUG, A. (1979) 30, 32, 36,
 38, 40
 Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.
J.Cell.Biol., 83, 403-427.
- 147 - THOMA, F. and KOLLER, Th. (1981) 38
 Unravelling nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: influence of non-histone components and histone H1.
J.Mol.Biol., 149, 709-733.

- 148 - THOMAS,G., LANGE,H.W. and HEMPEL,K.(1975) 11
Kinetics of histone methylation *in vivo*
and its relation to the cell cycle in
Ehrlich ascites tumor cells.
Eur.J.Biochem., 51, 609-615.
- 149 - THOMAS,J.O. and KORNBERG,R.D.(1975) 15,21,24
An octamer of histones in chromatin and
free in solution.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 2626-2630.
- 150 - THOMAS,J.O. and KHABAZA,J.A. (1980) 38
Cross-linking of histone H1 in chromatin.
Eur.J.Biochem., 112, 501-511.
- 151 - VANHOUTTE-DURAND,G., MIZON,J., SAUTIERE,P. and 6
BISERTE,G.(1977)
Histones from gonads of the star-fish
Asterias rubens.
Comp.Biochem.Physiol., 57B, 121-126.
- 152 - VIDALI,G., BOFFA,C., BRADBURY,E.M. and 10
ALLFREY,V.G. (1978)
Butyrate suppression of histone deacetyla-
tion leads to accumulation of multiacetyla-
ted forms of histones H3 and H4 and increased
DNase I sensitivity of the associated DNA
sequences.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 75, 2239-2243.
- 153 - VON HOLT,C., STRICKLAND,W.N., BRANDT,W.F. and 6
STRICKLAND,M.(1979)
More histone structure.
FEBS Letters, 100, 201-218.
- 154 - WALKER,J.M., HASTINGS,J.R.B. and JOHNS,E.W.(1977) 3
The primary structure of a non-histone
chromosomal protein.
Eur.J.Biochem., 76, 461-468.
- 155 - WALKER,J.M., PARKER,B.M. and JOHNS,E.W.(1978) 3
Isolation and partial sequence of the cya-
nogen bromide peptides from calf-thymus non-
histone chromosomal protein HMG 1.
Int.J.Peptide Protein Res., 12, 269-276.

- 156 - WALKER, J.M., GOODERHAM, K. and JOHNS, E.W. (1979) 3
The isolation, characterization and partial sequence of a peptide rich in glutamic acid and aspartic acid (HGA-2 peptide) from calf thymus non-histone chromosomal protein HMG 2. Biochem.J., 179, 253-254.
- 157 - WALKER, J.M., GOODWIN, G.H. and JOHNS, E.W. (1979) 3
The primary structure of the nucleosome associated chromosomal protein HMG 14. FEBS Letters, 100, 394-398.
- 158 - WALLACE, R.B., DUBE, S.K. and BONNER, J. (1977) 40
Localization of the globin gene in the template active fraction of chromatin of friend leukemia cells. Science, 198, 1166-1168.
- 159 - WEINTRAUB, H. and VAN LENTE, F. (1974) 22,27
Dissection of chromosome structure with trypsin and nucleases (histones/fingerprint/cleavage products/DNA electrophoresis/iodination). Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71, 4249-4253.
- 160 - WEINTRAUB, H., PALTER, K. and VAN LENTE, F. (1975) 41
Histones H2a, H2b, H3 and H4 form a tetrameric complex in solutions of high salt. Cell, 6, 85-110.
- 161 - WEINTRAUB, H. and GROUDINE, M. (1976) 40
Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. Science, 193, 848-856.
- 162 - WEINTRAUB, H., WORCEL, A. and ALBERTS, B. (1976) 41
A model for chromatin based upon two symmetrically paired half-nucleosomes. Cell, 9, 409-417.
- 163 - WEISBROD, S., GROUDINE, M. and WEINTRAUB, H. (1980) 40
Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes. Cell, 19, 289-301.

- 164 - WEISCHET, W.O. (1979) 41
On the de novo formation of compact oligo-
nucleosomes at high ionic strength. Evidence
for nucleosomal sliding in high salt.
Nucleic Acids Research, 7, 291-304.
- 165 - WEST, M.H.P. and BONNER, W.M. (1980) 12
Histone 2B can be modified by the attache-
ment of ubiquitin.
Nucleic Acids Research, 8, 4671-4680.
- 166 - WHITLOCK, J.P., AUGUSTINE, R. and SCHULMAN, H. (1980) 10
Calcium-dependant phosphorylation of histone
H3 in butyrate-treated Hela cells.
Nature, 287, 74-76.
- 167 - WILHELM, F.X. and CHAMPAGNE, M.H. (1969) 27
Dissociation de la nucléoprotéine d'éry-
throcytes de Poulet par les sels.
Eur.J.Biochem., 10, 102-109.
- 168 - WILKINS, M.H.F. (1956) 17
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 21, 75.
- 169 - WITTIG, B. and WITTIG, S. (1979) 41
A phase relationship associates tRNA struc-
tural gene sequences with nucleosome cores.
Cell, 18, 1173-1183.
- 170 - WORCEL, A. (1977) 34
Molecular architecture of the chromatin
fiber.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 42,
313-324.
- 171 - WORCEL, A., STROGATZ, S. and RILEY, D. (1981) 34
Structure of chromatin and the linking
number of DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78, 1461-1465.

- 172 - WOUTERS-TYROU, D., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. 6
(1976)
Covalent structure of the sea urchin
histone H4.
FEBS Letters, 65, 225-228.
- 173 - YAGUCHI, M., ROY, C. and SELIGY, V.L. (1979) 6
Complete amino acid sequence of goose
erythrocyte H5 histone and the homology
between H1 and H5 histones.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 90, 1400-1406.
- 174 - YU, S.S., LI, H.J., GOODWIN, G.H. and JOHNS, E.W. 3,30,41
(1977)
Interaction of non-histone chromosomal
proteins HMG 1 and HMG 2 with DNA.
Eur. J. Biochem., 78, 497-502.
- 175 - YU, S.S. and SPRING, T.G. (1977) 3,30
The interaction of non-histone chromoso-
mal proteins HMG 1 and HMG 2 with sub-
fractions of H1 histone immobilized on
agarose.
Biochim. Biophys. Acta, 492, 20-28.
- 176 - ZENTGRAF, H., MÜLLER, J. and FRANKE, W.W. (1980) 31
Reversible *in vitro* packing of nucleosomal
filaments into globular supranucleosomal
units in chromatin of whole chick erythro-
cyte nuclei.
Eur. J. Cell. Biol., 23, 171-188.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

CHAPITRE I.

ISOLEMENT, PURIFICATION, CARACTERISATION DE CINQ SOUS-FRACTIONS

DE L'HISTONE H1 D'ERYTHROCYTE DE POULET

MATERIELS ET METHODES

I - PREPARATION DES HISTONES TRES RICHES EN LYSINE

Dans l'érythrocyte de Poulet, les histones très riches en lysine sont représentées par les histones H1 et H5. L'histone H5 spécifique de l'érythrocyte nucléé est apparentée à l'histone H1 qu'elle remplace progressivement mais partiellement au cours de la maturation de la cellule.

Les histones H1 et H5 sont extraites ensemble de la chromatine.

Cette première étape a été réalisée dans le laboratoire de Mademoiselle M.CHAMPAGNE à l'I.B.M.C. de STRASBOURG (3,4).

A - PREPARATION ET HEMOLYSE DES ERYTHROCYTES

Le sang de poules blanches * adultes est collecté sur une solution de NaCl 0.15M, contenant 8 p.100 (M/V) d'héparine. Cette opération, ainsi que les suivantes, est réalisée à +2°C.

Après filtration sur gaze, les érythrocytes sont centrifugés 15' à 6500 r.p.m. (centrifugeuse BECKMAN J21) puis hémolysés par une solution de saponine à 2 p.1000 (M/V) en milieu NaCl 0.15M.

* fourni par M.MEYER à Wingersheim - FRANCE.

B - PREPARATION DE LA CHROMATINE

La chromatine, insoluble dans NaCl 0.15M, est recueillie par centrifugation 10' à 7000 r.p.m. et soumise à six lavages successifs en NaCl 0.15M en présence de quelques gouttes d'alcool octylique.

C - PREPARATION DES HISTONES TRES RICHES EN LYSINE

La chromatine est solubilisée dans l'eau distillée et, après homogénéisation, les histones H1 et H5 sont extraites une première fois par l'acide trichloracétique (TCA) ou l'acide perchlorique (PCA) à 5 p.100 (concentration finale).

Après une seconde extraction, les histones H1 et H5 sont finalement précipitées par le TCA (concentration finale: 15 p.100).

Le précipité est ensuite lavé trois fois par l'acétone acidifiée par HCl à -20°C et trois fois par l'acétone pure avant dessiccation sous vide (4).

Il est possible aussi d'extraire, à partir de la chromatine, les histones totales d'érythrocyte de Poulet par HCl 0.25N. Les histones H1, H5 sont alors précipitées conjointement, à partir de la solution d'histones totales, par l'acide perchlorique à 5 p.100 (M/V).

II - PURIFICATION DES HISTONES H1

Comme l'histone H1 désigne une famille de molécules étroitement apparentées, nous emploierons, pour la suite de notre exposé, ce vocable au pluriel pour désigner l'ensemble de ces molécules.

Deux méthodes peuvent être utilisées pour séparer l'histone H5 de l'histone H1 à partir du mélange.

A - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR CARBOXYMETHYL CELLULOSE

Cette méthode a été utilisée par CHAMPAGNE et coll.(3) pour séparer les histones H1 et H5. La colonne de cellulose modifiée (CM-cellulose-SERVA), équilibrée en tampon acétate de Na 0.1M, pH 4.2, est successivement éluée par NaCl 0.42M dans le même tampon pour décrocher H5. L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans le dessalage nécessaire de chaque fraction collectée.

B - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR BIOGEL P100

Cette technique, développée au laboratoire, nous permet d'obtenir des histones H1 exemptes de toute trace d'histone H5 ou de HMG 14 et 17 souvent présentes dans l'extrait perchlorique. Le mélange H1 + H5 est déposé sur la colonne en solution dans le chlorhydrate de guanidine à 40 p.100 dans

HCl 0.01M (à raison de 10 mg/ml). La colonne de Biogel P100 (100-200 mesh - BIORAD) (200x2.5cm) est équilibrée et éluée par HCl 0.01M saturé en chloroforme.

Il est à noter que nous n'employons plus ces méthodes de séparation que pour préparer des témoins histones H1. En effet la technique de séparation des sous-fractions d'histone H1 que nous avons mise au point au laboratoire s'applique directement au mélange H1 + H5.

Les différents contrôles de pureté, au cours des préparations, sont effectués par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans le système de PANYIM et CHALKLEY (12).

Nous avons dû prolonger le temps de migration électrophorétique afin d'augmenter la résolution des différentes bandes d'histone H1. Actuellement cette migration dure 4 heures à 22 mA dans un gel contenant 15 p.100 d'acrylamide et 2.5M d'urée. Le tampon de migration est de l'acide acétique 0.9M, pH 2.7. Les fractions déposées sont préalablement reprises, à raison de 1 mg/ml, dans une solution HCl 0.01M/ Urée 8M/2-mercapto-éthanol 0.5M contenant une trace de rouge de pyronine pour matérialiser le front de migration de l'électrophorèse.

Le gel est coloré pendant 30 minutes dans une solution de bleu de Coomassie (Coomassie brilliant blue R250) à 0.3 p.100 dans un mélange : éthanol/acide acétique/eau (20:7:73) (v/v) puis décoloré dans le même mélange, jusqu'à disparition du "fond" de coloration.

III - SEPARATION DES DIFFERENTES SOUS-FRACTIONS DE L'HISTONE H1

Après avoir essayé différents systèmes de séparation, nous avons fixé notre choix sur une méthode adaptée de HOHMANN (9). Nous utilisons une résine échangeuse de cations, Biorex 70 (200-400 mesh, BIORAD) dans une colonne de 200x2.5cm. Le tampon d'équilibration est le phosphate de sodium 0.1M, pH 6.8 contenant 9 p.100 (M/V) de chlorhydrate de guanidine (puriss.FLUKA ou ALDRICH) et du 2-mercapto-éthanol 0.1M.

Environ 1 g de l'échantillon d'histones très riches en lysine (que nous appellerons H1 + H5) est dissous dans quelques ml du même tampon contenant 40 p.100 (M/V) de chlorhydrate de guanidine (GuCl) et dialysé, à l'équilibre, contre du tampon phosphate seul, afin d'obtenir une fraction de dépôt à 9 p.100 (M/V) de GuCl.

Après application de l'échantillon ainsi préparé sur la résine, les sous-fractions d'histone H1 sont séparées par passage sur la colonne d'un gradient linéaire de concentration en chlorhydrate de guanidine entre 9 et 12 p.100.

Le volume total du gradient est de 4000 ml. Le débit appliqué à ce type de colonne est de 8 ml/h. Les fractions éluées de la résine sont collectées toutes les heures (500 fractions sont ainsi récupérées pendant le seul passage du gradient).

Après la fin du gradient, la résine est lavée par passage sur la colonne de 500 ml de tampon contenant 40 p.100 de GuCl.

La pente du gradient de concentration en chlorhydrate de guanidine est contrôlée par mesure de l'indice de réfraction de la solution (réfractomètre Carl ZEISS).

L'élution des protéines est contrôlée par turbidimétrie: à une fraction de 0.15 ml prélevée dans chaque tube de collection on ajoute de l'acide trichloracétique pour obtenir une concentration finale de 1.1M. La turbidité est lue à 400 nm sur un spectrophotomètre ZEISS PM1D.

Chacune des fractions provenant de la chromatographie d'échange d'ions est ensuite dessalée sur Sephadex G25 fine (PHARMACIA) ou sur Biogel P100 (BIORAD). Le premier support permet une purification beaucoup plus rapide mais le second sépare la protéine de ses produits de dégradation.

En effet nous avons pu constater que les histones H1 sont très sensibles à l'action des protéases et que leur conservation, même au froid, s'accompagne souvent d'une hydrolyse de la protéine. En général, nous utilisons en premier lieu le Sephadex G25 fine (colonne 100x5cm, débit 150 ml/h, éluant HCl 0.01N) et n'employons que le Biogel P100 qu'en cas de nécessité d'une purification ultérieure de la fraction (colonne 200x2.5cm, débit 15 ml/h, éluant HCl 0.01N).

Après dessalage, chaque fraction est lyophilisée et soumise à un contrôle électrophorétique. Outre le système de PANYIM et CHALKLEY (12) décrit plus haut, nous avons utilisé le système de séparation en gel de polyacrylamide décrit par ZWEIDLER (15). Cette technique met en oeuvre un gel de polyacrylamide à 17 p.100 d'acrylamide et contenant 2.5M d'urée et 6 mM de Triton X100 (BDH). A cette concentration d'urée les histones de la core-particle ont une mobilité électrophorétique faible par rapport à celle de l'histone H1. La séparation est effectuée après une pré-électrophorèse de deux

heures avec un dépôt de 0.01 ml de cystéamine 1M dans l'acide acétique à 5 p.100 dans chaque couloir de migration. L'électrophorèse proprement dite dure 4 heures à 22 mA. L'adjonction du détergent non ionique permet une bien meilleure résolution des sous-fractions d'histone H1.

La caractérisation de chaque fraction par sa migration électrophorétique est complétée par une composition en acides aminés.

Chaque fraction est hydrolysée par HCl 5.7N (1 ml/mg de protéine) en présence d'une goutte de phénol à 1 p.100 pour éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

L'hydrolyse est effectuée en tube scellé sous vide à 110°C, durant 24h et 72h.

Chaque hydrolysate est analysé au moins deux fois sur un analyseur d'acides aminés BECKMAN type Multichrom A équipé d'une colonne (60x0.9cm) de résine DURRUM DC6A ou sur un analyseur d'acides aminés BECKMAN type 119 CL équipé d'une colonne (60x0.6cm) remplie de la même résine. Sur les deux appareils, l'intégration et le calcul des données sont réalisés par un intégrateur-calculateur DELSI type ICAP-10.

RESULTATS ET DISCUSSION

I - PREPARATION DES HISTONES TRES RICHES EN LYSINE ET PURIFICATION DES HISTONES H1

A partir d'un litre de sang de Poulet on obtient, par extraction perchlorique ou trichloracétique, 1.5 à 1.8 g de mélange d'histones H1 + H5.

La figure 11 montre un électrophorégramme de contrôle sur lequel figurent les histones totales d'érythrocyte de Poulet (couloir 1), le mélange H1 + H5 (couloir 2) et les histones H1.

Le système de séparation électrophorétique de PANYIM et CHALKLEY fait apparaître quatre bandes de migration de l'histone H1 d'érythrocyte de Poulet. Toutefois la bande de moindre migration semble plus dense et moins homogène suggérant que celle-ci contient plusieurs protéines.

Nous pouvons remarquer la faible intensité de coloration des bandes d'histones H1 dans la fraction histones totales d'érythrocyte de Poulet (couloir 1). BATES et coll. (1) expliquent ce phénomène par une inadaptation du système de coloration/décoloration employé et préconisent une coloration très prolongée, plus spécifique des histones très riches en lysine, en solution diluée de colorant (Coomassie brilliant blue R250, 0.1 g/l).



HT-EP H1+H5 H1

FIGURE 11 : Electrophorégramme de contrôle des différentes étapes de préparation des histones H1 d'érythrocyte de Poulet. Acrylamide 15 p.100, urée 2.5M. La migration dure 4 heures à 22 mA.

HT EP : histones totales d'érythrocyte de Poulet
 H1 + H5 : extrait perchlorique

Nous pensons qu'il est préférable d'augmenter les quantités de protéine déposées sur le gel afin de bien montrer la faible quantité d'histones H1 face à l'histone H5 et aux histones de la core-particle.

La méthode de purification des histones H1 basée sur la chromatographie de gel filtration (Biogel P100) nous permet de récupérer, à partir de 40 mg de mélange H1 + H5, 10 mg d'histones H1. Nous rappelons que cette étape de purification n'est plus employée que pour obtenir un témoin histones H1. Le chromatogramme obtenu est toutefois présenté dans la figure 12.

II - SEPARATION DE DIFFERENTES SOUS-FRACTIONS D'HISTONE H1 D'ERYTHROCYTE DE POULET

La figure 13a présente un chromatogramme obtenu après dépôt de 1 g de mélange H1 + H5 sur la colonne de Biorex 70.

Quatre pics majeurs sont visibles sur ce diagramme. Chacun de ces pics a été fractionné et après purification chaque fraction a été analysée électrophorétiquement dans le système de PANYIM et CHALKLEY (12).

La figure 13b montre le gel de contrôle du diagramme 13a. La fraction 11 de la figure 13a correspond à l'histone H5 qui est éluée de la résine par GuCl 40 p.100. Approximativement 600 mg d'histone H5 ont été recueillis pour 1 g de mélange H1 + H5 déposé.

Les fractions hachurées du chromatogramme 13a représentent les sous-fractions d'histone H1 auxquelles nous nous

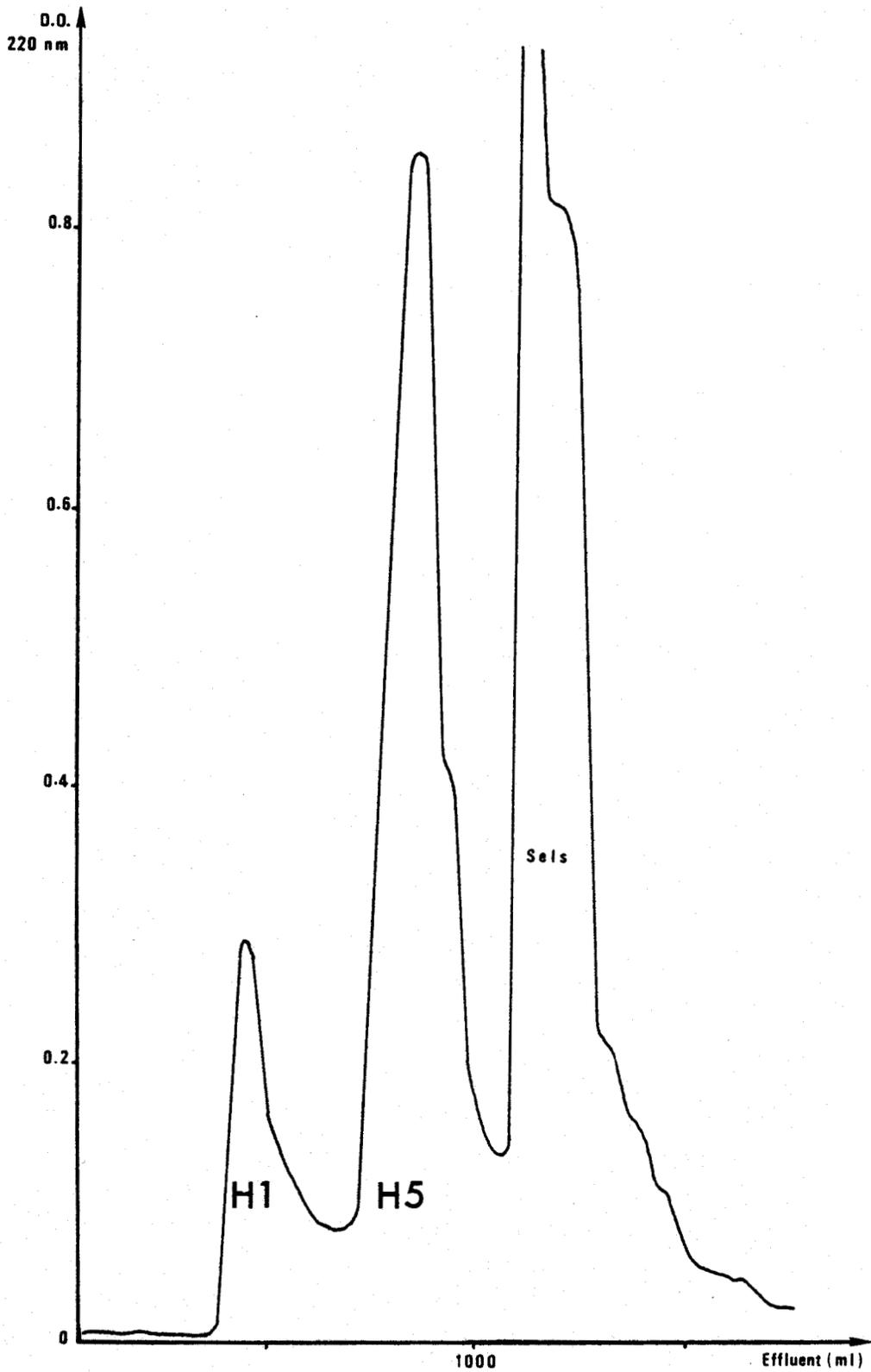


FIGURE 12 Purification des histones H1 d'érythrocyte de Poulet par chromatographie de gel filtration sur Biogel P100 (100-200 mesh) - colonne de 200x2.5cm - Elution par HCl 0.01M - Débit 12 ml/h - Collection 1 heure.

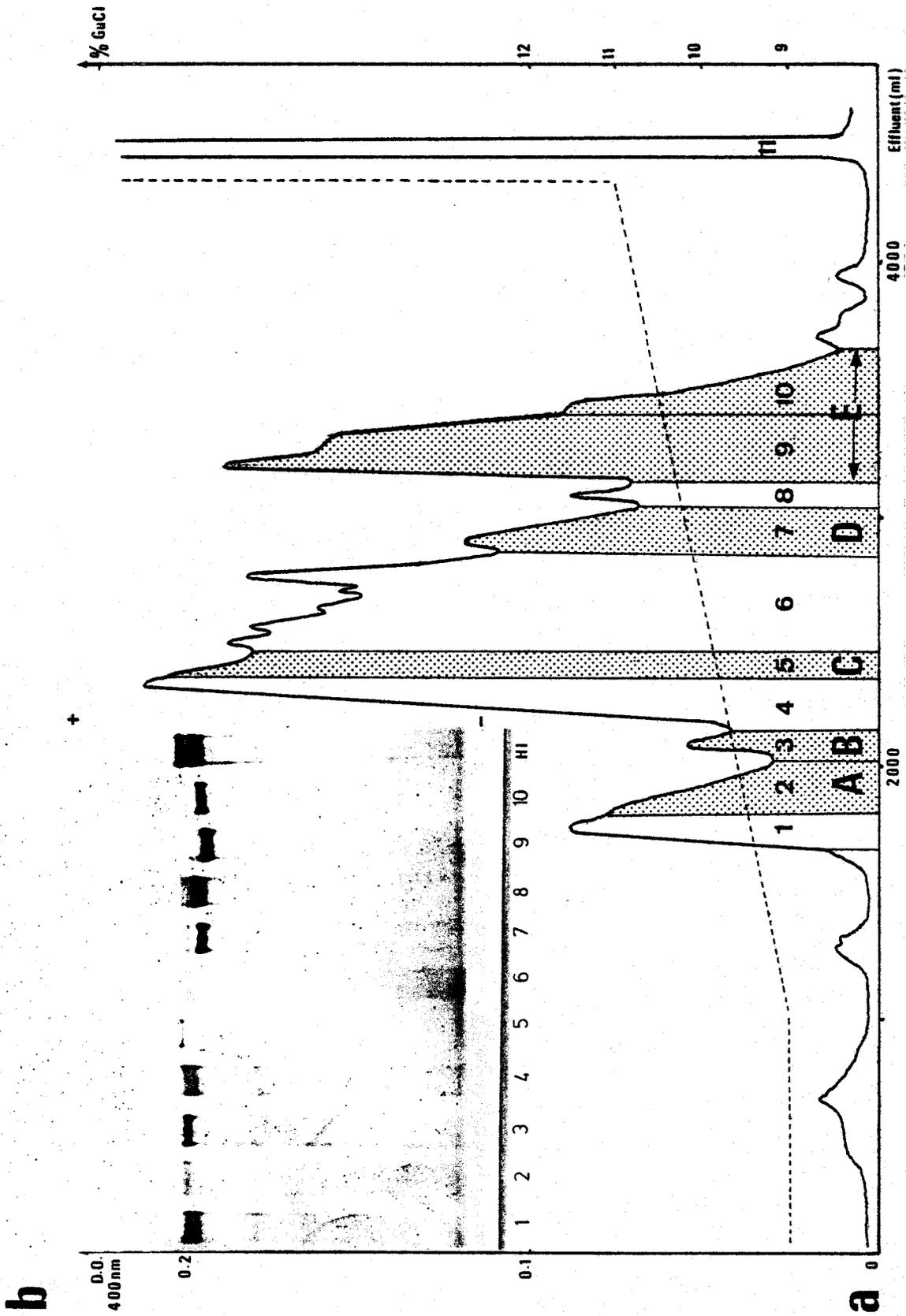


FIGURE 13 Séparation de différentes sous-fractions d'histone H1 d'érythrocyte de Poulet.

a) Chromatographie d'échange d'ions sur Biorex 70. Les fractions hachurées correspondent aux sous-fractions A, B, C, D, et E d'histone H1, séparées et caractérisées. La fraction 11 contient l'histone H5.

b) Electrophorèse de contrôle en gel de polyacrylamide dans le système de PANYIM et CHALKLEY (12). pH 2.7, urée 2.5M, 15 p.100 acrylamide. Gradient linéaire (---) de 9 à 12% de GuCl.

sommes plus particulièrement intéressés et que nous avons nommées, d'après leur ordre d'élution de la résine, H1A, H1B, H1C, H1D et H1E (respectivement fractions 2,3,5,7 et 9 à 10 du diagramme 13a).

Le tableau II indique la masse de protéine contenue dans chaque fraction après dessalage et purification éventuelle.

Nous n'avons pas, pour l'instant, pu expliquer l'hétérogénéité des fractions 1 et 4 de la figure 13.

Les histones H1A et H1B présentent des vitesses de migration électrophorétique très peu différentes et sont, d'autre part, peu représentées quantitativement au sein de la famille histones H1. Toutefois elles sont suffisamment pures pour être répertoriées et caractérisées.

Nos premières tentatives de séparation des sous-fractions d'histones H1 d'érythrocyte de Poulet utilisaient des hauteurs de résine plus faibles et des débits plus élevés. Ces techniques nous permettaient d'obtenir un chromatogramme de profil comparable à celui de la figure 13a, mais dont le pic central (fractions 4 à 7) était rigoureusement homogène. Pendant longtemps cette impossibilité à séparer les sous-fractions C et D de l'histone H1 d'érythrocyte de Poulet a constitué un obstacle majeur au déroulement de nos travaux. En effet ces deux sous-fractions sont très nettement majeures dans les histones H1 et il eut été regrettable de ne pas pouvoir les étudier plus précisément. Ce n'est qu'après avoir adopté un débit d'élution très faible (8 ml/h) que nous avons pu obtenir l'amorce de séparation constatée sur la figure 13.

TABLEAU II

MASSE DE PROTEINE RECUEILLIE DANS CHAQUE FRACTION DE LA FIGURE 13a

Numéro de la fraction (Fig.13)	1	H1A 2	H1B 3	4	H1C 5	H1C+H1D 6	H1D 7	8	9	H1E 10	Total
Masse de protéine récupérée pour chaque fraction* (mg)	19.5	20.0	9.0	47.0	9.7	79.0	22.5	10.5	59.8	24.0	304

* La masse totale de mélange H1 + H5 déposée sur la colonne est de 1 g.



Cette séparation, bien qu'imparfaite, nous permet toutefois de caractériser ces deux protéines, en particulier par leur composition en acides aminés. Nous pourrions par la suite définir une stratégie de séparation plus adaptée à l'originalité de ces molécules afin d'aborder l'étude de leur structure primaire.

Une étude préliminaire nous a permis de constater que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, à l'échelon préparatif, constituait une excellente méthode de séparation des histones H1C et H1D. Malheureusement le rendement d'extraction de la protéine du gel de polyacrylamide est extrêmement faible.

La fraction 8 (Fig.13) est électrophorétiquement hétérogène (Fig.13b, couloir 10). Elle renferme un constituant majeur de migration intermédiaire à celles des histones H1D et H1E et est contaminée par ces deux protéines. Nous avons nommé ce constituant H1D' mais, compte tenu de son médiocre degré de pureté, nous ne l'avons pas caractérisé.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la sous-fraction H1E. En effet, dès nos premières séparations, il nous est apparu que cette molécule était éluée, de façon apparemment homogène, entre 10.25 et 10.60 p.100 de GuCl . Ceci nous a permis de préparer des quantités suffisantes d'histone H1E et d'en commencer l'étude structurale.

L'électrophorèse des histones H1 en gel de polyacrylamide dans le système de PANYIM et CHALKLEY (12) ne permet de visualiser que 4 bandes, alors que 6 sous-fractions sont obtenues par chromatographie de ces histones H1 sur Biorex 70.

Nous avons donc tenté d'utiliser des systèmes électrophorétiques plus résolutifs en ce qui concerne le cas particulier des histones H1. La figure 14 présente un électrophorégramme réalisé dans le système de ZWEIDLER (15) en présence de Triton X100. L'utilisation du détergent non ionique nous a permis de constater que la sous-fraction H1E était en fait très légèrement contaminée par un constituant de plus faible mobilité électrophorétique et élué immédiatement après la fraction H1E (aux environs de 10.60 p.100 de GuCl) (Figure 14, couloir 9).

Les premiers résultats que nous avons obtenus dans l'étude structurale de l'histone H1E nous inclinent à considérer ce contaminant présent en très faible quantité comme un variant de H1E. Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre suivant. Il n'était donc pas utile de chercher à purifier H1E.

Après analyse électrophorétique, chacune des fractions H1A, H1B, H1C, H1D et H1E a été soumise à une hydrolyse acide totale afin d'en déterminer la composition en acides aminés. Les résultats sont présentés dans le tableau III. A titre de comparaison, nous avons inclus dans le même tableau la composition en amino-acides de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet.

Nous pouvons tout d'abord remarquer la nette ressemblance entre les différentes sous-fractions de H1. Ceci explique les difficultés que nous rencontrons au cours des étapes de séparation et de purification de ces protéines.

Les histones H1 d'érythrocyte de Poulet ne possèdent ni cystéine, ni histidine, ni méthionine. Toutes contiennent par contre un seul résidu de phénylalanine, comme l'histone H5 et dix résidus de leucine.

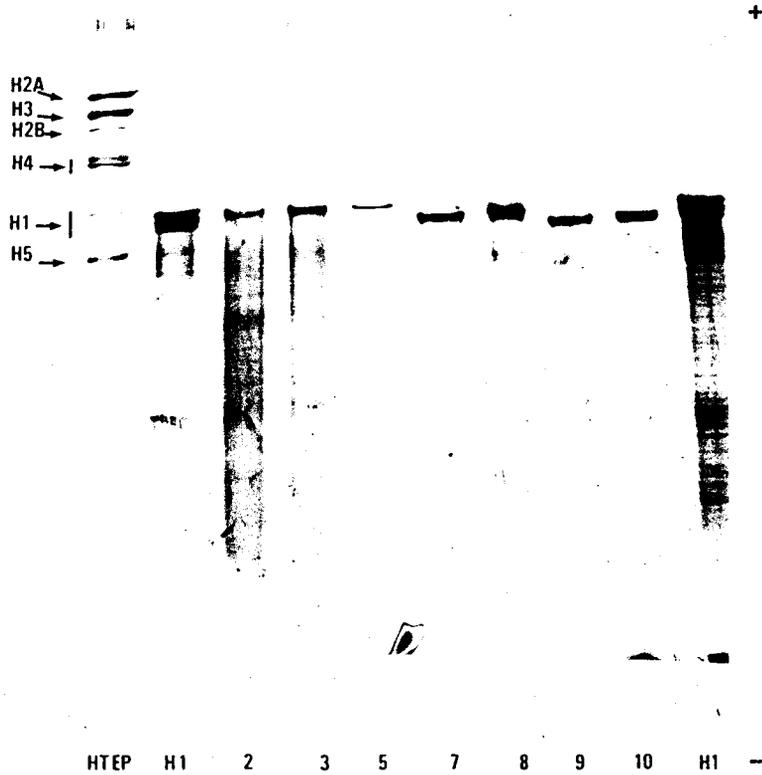


FIGURE 14 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide dans le système de ZWEIDLER (15)
 Acrylamide 17 p.100, urée 2.5M, triton X100 6mM - Migration 4 heures à 22 mA.
 La numérotation des fractions correspond à celle de la figure 13.
 HT EP : histones totales d'érythrocyte de Poulet.

TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE CINQ SOUS-FRACTIONS D'HISTONE H1 ISOLEES DU NOYAU
D'ERYTHROCYTE DE POULET (a)

HISTONE	H1A	H1B	H1C	H1D	H1E	H5
ACIDES AMINES						
Acide aspartique	4.1(4)	4.2(4)	3.9(4)	3.1(3)	4.2(4)	3
Thréonine (b)	9.9(10)	9.3(9)	8.1(8)	6.9(7)	11.2(11)	6
Sérine (b)	16.2(16)	14.6(15)	13.6(14)	13.9(14)	14.6(15)	26
Acide glutamique	8.1(8)	6.7(7)	7.0(7)	6.9(7)	7.4(7)	7-8
Proline	23.5(23-24)	20.6(21)	18.3(18)	18.7(19)	20.3(20)	13
Glycine	14.2(14)	11.4(11-12)	11.0(11)	11.5(11-12)	13.6(14)	9
Alanine	48.9(49)	55.2(55)	43.2(43)	54.8(55)	58.3(58)	29
Cystéine	-	-	-	-	-	-
Valine	10.0(10)	12.4(12-13)	10.9(11)	8.6(9)	9.5(9-10)	8
Méthionine	-	-	-	-	-	1
Isoleucine	1.6(2)	1.8(2)	3.3(3)	2.0(2)	1.9(2)	6
Leucine	10.2(10)	9.8(10)	9.7(10)	10.0(10)	9.9(10)	8
Tyrosine	1.1(1)	0.6(1)	1.7(2)	1.0(1)	0.8(1)	3
Phénylalanine	1.1(1)	1.0(1)	1.0(1)	0.9(1)	1.2(1)	1
Histidine	-	-	-	-	-	3
Lysine	51.1(51)	58.4(58-59)	46.2(46)	52.5(52-53)	61.7(62)	44
Arginine	4.9(5)	3.9(4)	6.4(6-7)	4.6(5)	4.9(5)	21-22
Nombre total de résidus(calculé)	204-205	210-213	184-185	196-198	219-221	189
Taux de résidus basiques (%)	27.4%	28.7%	28.3%	29.1%	30.4%	34.4%
Rapport LYS/ARG	10.20	14.50	7.70	10.40	6.10	2.00

(a) Exprimées en nombre de résidus par mole de protéine. La valeur entre parenthèses indique le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.

(b) Les valeurs données pour les résidus de sérine et thréonine sont obtenues par extrapolation linéaire au temps 0 de l'hydrolyse acide.

Les acides aminés majeurs sont, dans tous les cas, la lysine, l'alanine et la proline qui représentent respectivement 25, 25 et 10 p.100 des résidus.

Les sous-fractions H1A et H1B ne présentent pas de caractères particuliers ni d'originalité de composition.

L'histone H1C se distingue, à la fois par son taux élevé d'arginine et par la présence de deux résidus de tyrosine et trois résidus d'isoleucine. Les autres sous-fractions ne renferment qu'un résidu de tyrosine et deux résidus d'isoleucine.

L'histone H1D se différencie des autres sous-fractions par un taux d'acide aspartique plus faible.

L'histone H1E est caractérisée par un taux important de résidus basiques (30.4 p.100) et d'alanine et une taille moléculaire élevée (220 résidus calculés). C'est la plus basique des cinq sous-fractions caractérisées des histones H1, ce qui explique probablement sa plus grande mobilité cathodique en électrophorèse ainsi que son élution tardive de la colonne de Biorex 70.

Ainsi, 5 sous-fractions d'histone H1 d'érythrocyte de Poulet ont été caractérisées par des critères chromatographiques, électrophorétiques et chimiques (composition en acides aminés). En fait pour cette famille de protéines étroitement apparentées, la composition en acides aminés est le seul critère valable qui permette de les distinguer. A ce point de notre discussion, il nous paraît important de souligner qu'aucune de ces sous-fractions, surtout la plus basique, H1E, ne présente d'analogies de composition avec l'histone H5 sauf en ce qui concerne le nombre de résidus d'acides aminés dicarboxyliques et de phénylalanine qui sont semblables dans les histones H1 et H5.

Il est nécessaire maintenant de pousser plus loin l'étude structurale de ces molécules pour savoir quelles sont les zones structurellement différentes des cinq sous-fractions caractérisées. Le rôle biologique de chacune de ces histones H1 ne pourra être compris qu'à ce prix. Nous avons entamé l'étude de la séquence en acides aminés de la sous-fraction H1E d'érythrocyte de Poulet et cette étude fait l'objet du second chapitre de notre travail.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H1E

D'ERYTHROCYTE DE POULET

I - CHOIX D'UNE STRATEGIE

Après les travaux réalisés dans notre laboratoire par BRIAND et coll. (2) nous avons pensé qu'une partie de la stratégie adoptée pour l'élucidation de la structure primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet pourrait être utilisée pour la détermination de la séquence en acides aminés de l'histone H1E. En effet, la comparaison des compositions en aminoacides de ces deux protéines (tableau III, p.90) fait apparaître une similitude intéressante : l'existence dans la molécule d'un seul résidu de phénylalanine, qui dans l'histone H5 est situé en position médiane (résidu 93). L'hydrolyse pepsique de l'histone H5 a permis de libérer, avec un rendement de 80 p.100, le fragment de 96 résidus (résidus 94 à 189) correspondant à la moitié COOH-terminale de la protéine.

Nous avons donc soumis l'histone H1E à une hydrolyse par la pepsine dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'histone H5. Mais cette première approche s'est révélée décevante dans la mesure où nous n'avons pas obtenu un gros fragment correspondant à la partie COOH-terminale de la protéine et aisément séparable des autres peptides de l'hydrolysat. Toutefois certains parmi ces peptides provenant des régions NH₂-terminale et centrale de l'histone H1E ont pu être isolés et séquencés.

Les premiers résultats obtenus grâce à cette coupure enzymatique nous ont amenés à utiliser ensuite l'acide acétique 0.25M pour énucléer spécifiquement les résidus d'acide aspartique mis en évidence dans la structure primaire de l'histone H1E.

Les deux méthodes de coupure de l'histone H1E d'érythrocyte de Poulet utilisées jusqu'à ce jour nous ont permis de déterminer la structure primaire d'un certain nombre de fragments qui recouvrent des séquences de 34 et 46 résidus, comprises entre les résidus 10 et 43 d'une part et 61 et 106 d'autre part, par comparaison avec la séquence de la sous-fraction 3 des histones H1 de thymus de Lapin (RTL 3) (6).

II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

A - HYDROLYSES ENZYMATIQUES

1 - Hydrolyse par la pepsine

50 mg d'histone H1E sont dissous dans 2 ml d'acide formique à 5 p.100. La pepsine (EC 3.4.23.1, Worthington) est utilisée dans un rapport Enzyme/Substrat de 1/50. L'hydrolyse est conduite pendant 2 heures à 37°C et arrêtée par abaissement brutal de la température à -80°C. L'hydrolysate est immédiatement lyophilisé. Les peptides obtenus par action de la pepsine ont été nommés peptides P.

2 - Hydrolyse par la protéase de *Staphylococcus aureus* - souche V8 (EC 3.4.21.19, Miles)

Le peptide est dissous, à raison de 10 mg/ml dans HCl 0.01M. Après addition d'un volume équivalent de tampon $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.1M, pH 4.0, l'enzyme est ajouté pour établir un rapport

Enzyme/Substrat de 1/50. Après 15 heures d'hydrolyse à 37°C, l'hydrolysats est lyophilisé. Les fragments obtenus par ce type de coupure ont été appelés peptides SP.

3 - Hydrolyse par la Trypsine (traitée par le Tos Phe CH₂Cl*)
(Worthington) (EC 3.4.21.4).

Le peptide est dissous dans le tampon N-methyl morpholine-acétate 0.1M, pH 8.0. L'enzyme est ajouté en deux fois, une première fois au temps 0 de l'hydrolyse, une deuxième fois après 1 heure d'hydrolyse. Le rapport final Enzyme/Substrat est de 1/50. L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu au bout de 2 heures par abaissement du pH à pH 3.5 avec HCOOH. L'hydrolysats est alors lyophilisé. Les peptides tryptiques ont été désignés par la lettre T.

B - COUPURE CHIMIQUE DE L'HISTONE H1E PAR L'ACIDE ACETIQUE 0.25M

20 mg de la sous-fraction H1E sont dissous dans 2 ml d'acide acétique 0.25M et hydrolysés en tube scellé sous vide à 105°C pendant 15 heures. L'hydrolysats est ensuite lyophilisé. Les peptides obtenus par énucléation de l'acide aspartique ont été nommés peptides Ac.

* Tos Phe CH₂Cl : N-tosylphénylalananyl chlorométhane

C - METHODES DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

1 - Fractionnement de l'hydrolysate pepsique

L'hydrolysate est déposé sur une colonne de Sephadex G50 fine (PHARMACIA) (200x2.5cm) équilibrée et éluee par HCl 0.01M saturé au CHCl_3 . Les peptides sont repérés par lecture de la densité optique de l'éluate à 220 nm (et à 274.5 nm pour les fractions contenant des résidus aromatiques).

2 - Fractionnement de l'hydrolysate acétique

Le dépôt est effectué sur une colonne de Sephadex G100 superfine (100x2.5cm) (PHARMACIA) équilibrée et éluee par HCl 0.01M saturé en CHCl_3 . Les peptides sont repérés dans l'éluate comme précédemment.

3 - Chromatographie liquide à haute pression

Nous avons utilisé cette technique pour la séparation et la purification de peptides pepsiques contenus dans des fractions hétérogènes provenant de la chromatographie sur Sephadex G50, et pour le fractionnement des hydrolysats obtenus par action de la protéase staphylococcique et de la trypsine.

Dans tous les cas nous avons utilisé une colonne de micro-Bondapak C_{18} (9 μm , 0.39x30cm) (Waters Associates) et un système de séparation à 2 solvants :

- Solvant A : Acide trifluoroacétique (TFA) 0.05 p.100 (v/v) (Sequanal grade, PIERCE).

- Solvant B : TFA 0.05 p.100, acétonitrile 50 p.100 (v/v) (RS-HPLC, CARLO ERBA).

Les peptides sont séparés par élution dans un gradient de concentration en acétonitrile établi par un appareil Waters Associates, type ALC/CPG 244, équipé d'un injecteur U6K et d'un spectrophotomètre Cecil 212 à longueur d'onde variable. Les échantillons sont dissous dans le solvant A à raison de 1 à 2 mg/ml. Les conditions particulières de gradient (forme, pente, limites) seront décrites dans les légendes des figures.

D - METHODES ANALYTIQUES

1 - Contrôle électrophorétique

L'analyse des peptides par électrophorèse en gel de polyacrylamide est réalisée à pH 2.7 en milieu urée 2.5M avec une concentration en acrylamide de 17 p.100 (12). Une pré-électrophorèse d'une heure est réalisée avant le dépôt des échantillons, pour éviter que les petits peptides ne soient entraînés avec le front de migration. La séparation électrophorétique des peptides s'effectue durant 1 heure à 22 mA. Le système de mise en solution des échantillons et le système de coloration/décoloration ont déjà été décrits (ch.I, p 76).

2 - Analyse d'acides aminés

Les peptides sont hydrolysés par HCl 5.7N pendant 24 heures à 110°C en tubes scellés sous vide. Les analyses d'acides aminés sont effectuées sur un analyseur Beckman type 119CL équipé d'une colonne (0.6x40cm) de résine DURRUM DC6A et d'un intégrateur-calculateur DELSI type ICAP10.

3 - Dégradation manuelle de EDMAN

Les peptides de faible taille moléculaire ont été soumis à la dégradation manuelle de EDMAN (7). Les phénylthiohydantoïnes d'acides aminés (PTH-AA) formées ont été identifiées par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) sur une colonne micro-Bondapak C18 (Waters Associates), montée sur un chromatographe Hewlett-Packard 1084D (8).

Les PTH de la valine, de la phénylalanine et de l'isoleucine ont été séparées sur une colonne de cyanopropylsilane (micro-Bondapak CN, Waters Associates) (8) ou identifiées par chromatographie en phase gazeuse (colonne WHP 100-200 mesh imprégnée de chlorophénylsilicone SP400 à 10 p.100) (13).

Nous avons également employé une méthode de dégradation manuelle utilisant le 4-NN diméthylaminoazobenzène 4'-isothiocyanate (DABITC-Fluka) en association avec le phénylisothiocyanate (PITC) lors de la réaction de couplage, première étape de la dégradation de EDMAN (5). Le dérivé d'acide aminé (DABTH-AA) formé à chaque cycle de dégradation est identifié par chromatographie sur couche mince de polyamide (5) dans un système de migration bidimensionnelle :

BUS
LILLE

- 1ère dimension : Acide acétique/eau (1:2) (v/v)
- 2ème dimension : Toluène/n Hexane/acide acétique (2:1:1) (v/v).

A la fin de la migration les plaques sont soigneusement séchées et exposées aux vapeurs d'HCl. Les DABTH-AA apparaissent alors colorés en rouge. Les dérivés de thréonine et de lysine sont colorés en bleu.

Cette méthode augmente de 10 à 20 fois la sensibilité de la technique de dégradation manuelle de EDMAN, mais la séparation des DABTH-AA par chromatographie sur couche mince ne permet pas la quantification de ces dérivés. Nous l'avons surtout utilisée pour déterminer l'extrémité NH₂-terminale de certains peptides.

4 - Dégradation automatique de EDMAN

La détermination de structure primaire des grands fragments peptidiques a été réalisée sur un séquenceur Beckman 890C avec un programme diméthylallylamine (102974) et en présence d'un "mainteneur" : le polybrène (14,11).

Les PTH-AA ont été identifiées selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent.

III - RESULTATS

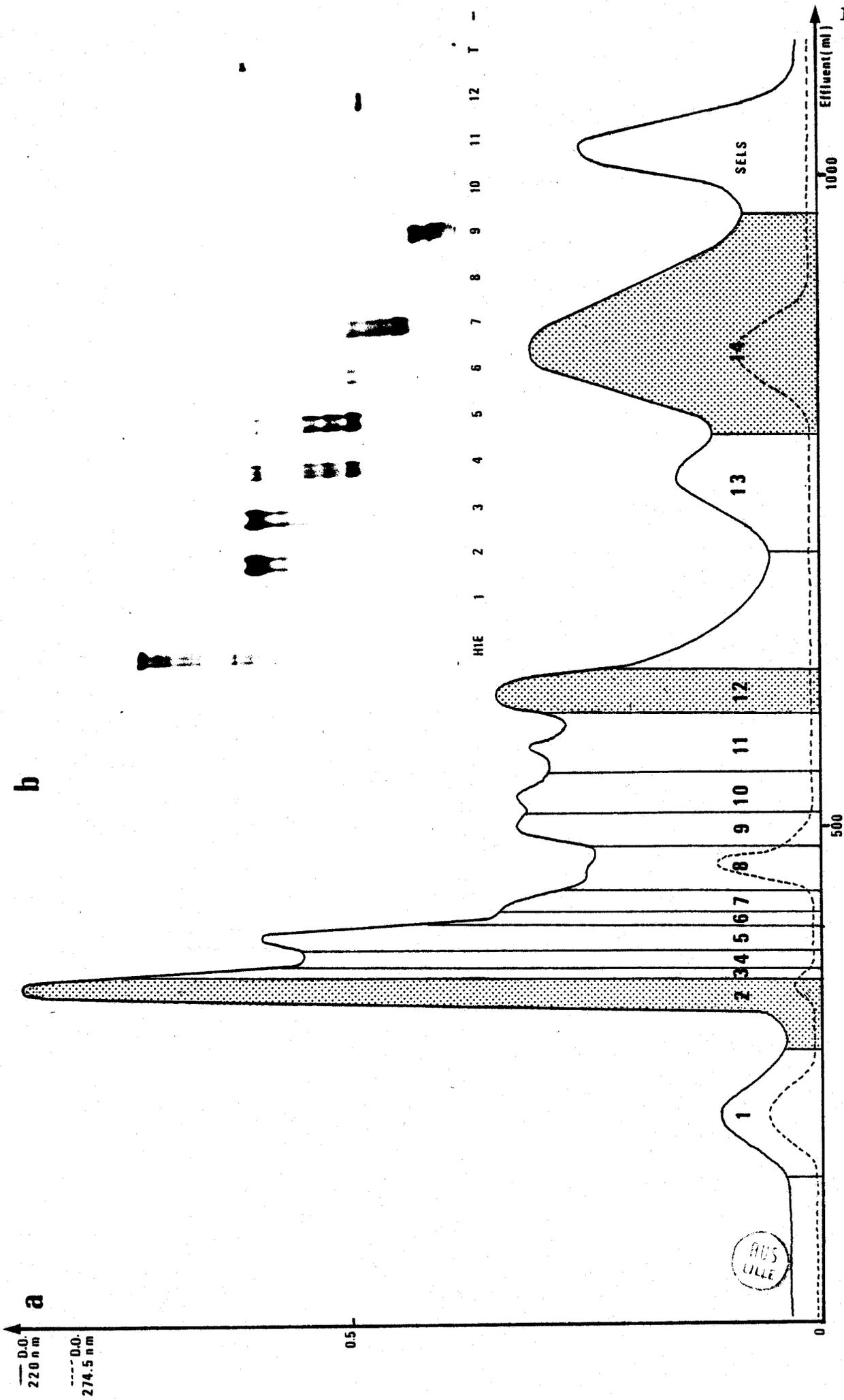
A - COUPURE DE L'HISTONE H1E PAR LA PEPSINE

Le diagramme d'élution des peptides pepsiques de l'histone H1E, fractionnés sur Sephadex G50, est présenté dans la figure 15a. La figure 15b montre l'analyse électrophorétique des douze premières fractions de ce diagramme. Les fractions 13 et 14 ont été analysées en HPLC.

Une étude préliminaire de chacune de ces fractions nous a conduit à ne nous intéresser qu'aux fractions 1, 11 et 14 du diagramme 15a. Les autres fractions de cette chromatographie se sont avérées extrêmement difficiles à utiliser du fait de leur hétérogénéité et de la faible quantité de produit recueillie.

Les fractions 1 et 11 (Figure 15) contiennent chacune un peptide de pureté satisfaisante. Ces deux peptides ont été hydrolysés et nous en avons déterminé la composition en acides aminés. Le peptide de la fraction 1 a été soumis à la dégradation automatique de EDMAN. Le peptide de la fraction 11 a été soumis à l'action de la protéase staphylococcique et de la trypsine. Nous en avons déterminé la séquence des 33 premiers résidus.

La fraction 14 contient un grand nombre de petits peptides qui ont été séparés en HPLC. Certains de ces peptides ont été séquencés.



H1E

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 T -

Nous allons maintenant détailler l'étude de chacune des fractions 1, 11 et 14 de la figure 15.

1 - Etude de la fraction 1

L'action de la pepsine sur l'histone H1E d'érythrocyte de Poulet avait pour but la coupure de la seule liaison phénylalanyle de la molécule et nous espérons obtenir ainsi un grand peptide COOH-terminal comparable au peptide Px de l'histone H5 (2).

Le tableau IV présente la composition en amino-acides du peptide de la fraction 1 comparativement à celles du peptide Px et de la séquence des résidus 107 à 213 de la sous-fraction RTL-3 de l'histone H1 de thymus de Lapin (la phénylalanine se trouve en position 106 dans cette histone) (6).

Ce peptide contient 66 p.100 des résidus basiques, 57 p.100 de l'alanine et 65 p.100 de la proline de l'histone H1E. On peut noter l'absence d'isoleucine et d'acides aromatiques et la faible quantité de leucine, d'arginine et de glycine au sein de ce peptide.

Ces caractéristiques chimiques ainsi que la faible mobilité électrophorétique de ce peptide nous ont conduit à penser qu'il s'agissait effectivement du peptide COOH-terminal de l'histone H1E obtenu par coupure peptidique de la liaison phénylalanyle. Nous avons nommé ce peptide Pc.

320 nM de ce peptide ont été obtenus par hydrolyse d'environ 2 μ M d'histone. Le rendement d'obtention du peptide Pc

TABLEAU IV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU PEPTIDE 1 OBTENU PAR HYDROLYSE
PEPSIQUE DE L'HISTONE H1E D'ERYTHROCYTE DE POULET.
COMPARAISON AVEC LA SEQUENCE 107-213 DE L'HISTONE RTL-3 (6) ET
AVEC LE PEPTIDE Px DE L'HISTONE H5 (2).

Peptide Acide aminé	Peptide 1	Séquence 107-213* de RTL-3	Peptide Px de H5*	Histone H1E
Acide aspartique	1.0(1)	1	1	4
Thréonine	4.5(5)	3	3	11
Sérine	4.2(4)	3	12	15
Acide glutamique	2.0(2)	1	-	7-8
Proline	13.3(13)	17	9	20
Glycine	2.2(2)	4	2	14
Alanine	32.9(33)	29	17	58
Valine	2.7(3)	4	3	9-10
Isoleucine	-	-	-	2
Leucine	1.0(1)	1	1	10
Tyrosine	-	-	-	1
Phénylalanine	-	-	-	1
Lysine	43.3(43)	44	34	62
Arginine	1.5(1-2)	-	14	5
Total	108-109	107	96	219-220

* tiré de la séquence

Les résultats sont présentés en nombre de résidus par mole de peptide ou de protéine. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.



de l'histone H1E (16 p.100) est donc très faible comparative-
ment au rendement d'obtention du peptide Px de l'histone H5
(80 p.100) (2).

Le peptide Pc a été soumis à la dégradation automatique
de EDMAN. 15 cycles de dégradation ont été effectués et chacun
d'eux a révélé l'existence de plusieurs PTH-AA avec en particu-
lier un "bruit de fond" constant de PTH-lysine, PTH-alanine et
PTH-proline, correspondant aux acides aminés majeurs du peptide
Pc.

Nous pensons que ce peptide a pu subir des coupures secon-
daires de la chaîne peptidique au cours de sa conservation ou
des étapes de clivage de la dégradation de EDMAN.

Nous n'avons donc pas pu établir la structure primaire
de ce peptide.

2 - Etude de la fraction 11

La composition en amino-acides du peptide contenu dans
la fraction 11 de la figure 15 figure dans le tableau V. La
faible basicité de ce peptide explique probablement sa faible
migration cathodique en électrophorèse (Figure 15b).

Ce peptide ne contient pas d'acide aspartique ni d'iso-
leucine, ni d'acides aminés aromatiques. Il contient un nombre
élevé de résidus d'alanine et de proline. D'après ce que nous
connaissions des structures d'histones H1 et en particulier de
la sous-fraction RTL-3, ce peptide est situé vraisemblablement
dans la zone NH₂-terminale de l'histone H1E et l'avons par con-
séquent appelé Pn.

TABLEAU V

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES Pn, Pn-SP, Pn-T1 et Pn-T2

	Pn	Pn-SP	Pn-T1	Pn-T2
Acide aspartique	-	-	-	-
Thréonine	0.9(1)	1.0(1)	-	0.9(1)
Sérine	1.6(2)	1.2(1)	0.8(1)	1.0(1)
Acide glutamique	1.2(1)	1.5(1-2)	-	1.0(1)
Proline	4.8(5)	4.0(5)*	1.9(2)	1.7(2)
Glycine	3.5(3-4)	3.1(3)	1.0(1)	1.1(1)
Alanine	10.9(11)	8.6(9)	3.1(3)	1.1(1)
Valine	1.5(1-2)	2.1(2)	1.0(1)	0.9(1)
Isoleucine	-	-	-	-
Leucine	0.8(1)	1.0(1)	-	1.0(1)
Tyrosine	-	-	-	-
Phénylalanine	-	-	-	-
Lysine	7.8(8)	6.4(6-7)	1.1(1)	0.9(1)
Arginine	0.8(1)	0.9(1)	-	-
Total	34-36	30-32	9	10

* corrigé d'après la séquence

Les résultats sont présentés en nombre de résidus par mole de peptide. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.



Le peptide Pn contient un seul résidu d'acide glutamique qui constitue un site spécifique de coupure par la protéase de *Staphylococcus aureus* (souche V8) en présence de sels d'ammonium (10). L'hydrolysate obtenu a été fractionné par chromatographie liquide à haute pression et le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 16.

La fraction hachurée de cette figure contient un peptide que nous avons nommé Pn-SP et dont la composition figure dans le tableau V. D'après ces résultats le peptide Pn-SP est plus court que le peptide Pn de 2 à 6 résidus.

La méthode de dégradation manuelle utilisant le DABITC nous a permis d'établir la séquence NH₂-terminale de ce peptide:

Pro - Ala - Val

Le peptide Pn-SP a été ensuite soumis à la dégradation automatique de EDMAN.

L'identification positive des PTH-amino-acides a pu être réalisée jusqu'au 30ème cycle (Tableau VI):

10

Pro-Ala-Val-Ser-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-

20

Lys-Lys-Ala-Ala-Gly-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-^{Lys}/_{Arg}-Pro- ? -Gly-Pro

30

Toutefois aucun PTH-AA n'a pu être identifié avec certitude au cycle 28.

Une microhétérogénéité a pu être observée en position 26 de ce peptide, où PTH-Lys et PTH-Arg ont été identifiés et quantifiés dans les mêmes proportions.

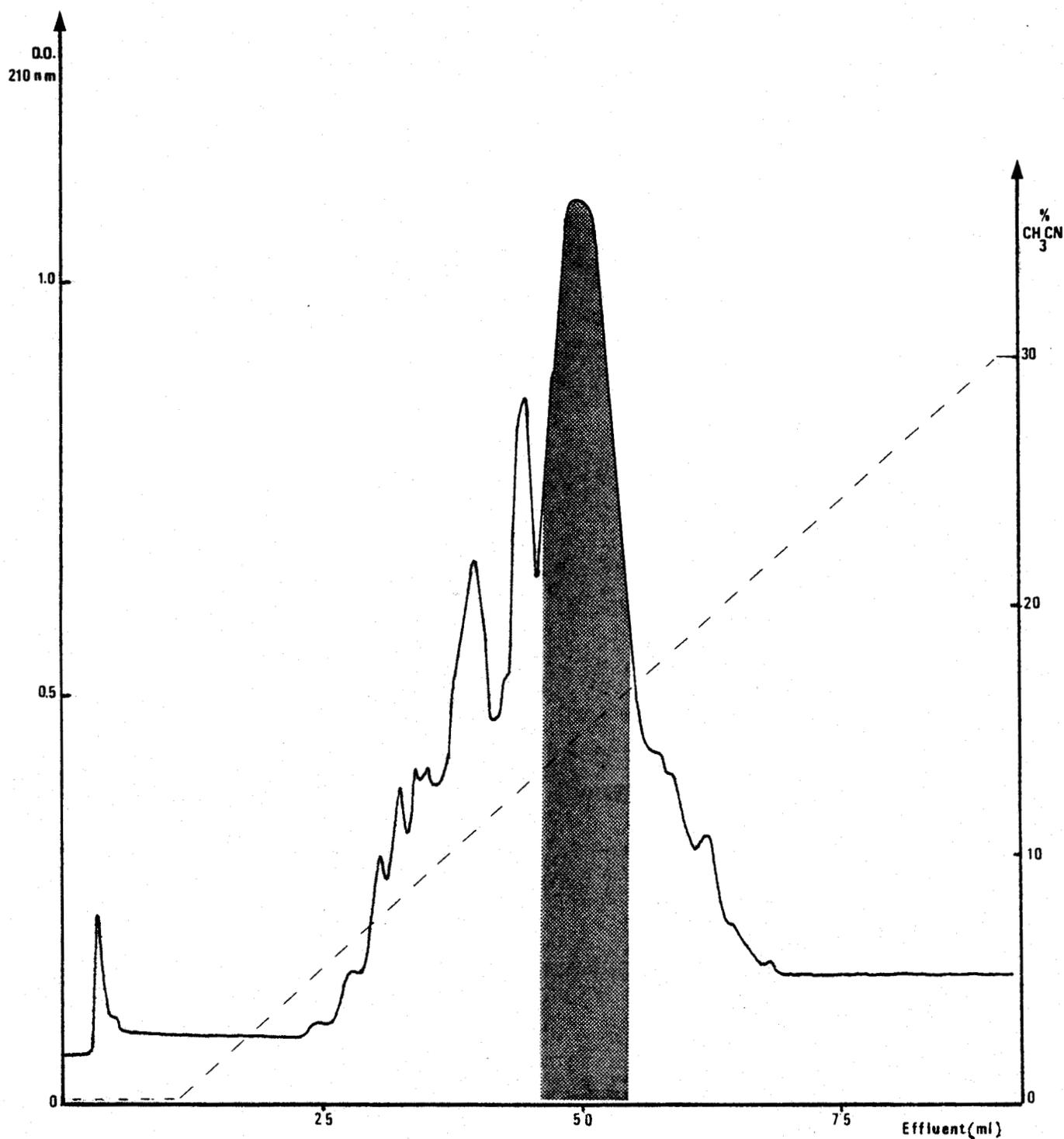


FIGURE 16 Purification du peptide Pn-SP en HPLC.

Chromatographie à haute pression sur colonne de micro-Bondapak C₁₈ (0.39x30cm), éluée par un gradient de 0 à 30 p.100 d'acétonitrile dans le TFA 0.05 p.100. Débit 2 ml/minute.

La fraction hachurée contient le peptide Pn-SP.



Le peptide Pn a d'autre part soumis à une hydrolyse trypsique pour essayer d'en compléter la séquence. La chromatographie liquide à haute pression nous a permis de séparer les peptides obtenus. La figure 17 montre le chromatogramme de cette séparation. Toutes les fractions ont fait l'objet d'une analyse d'acides aminés mais nous n'avons poussé l'étude que des seules fractions hachurées, majeures, du chromatogramme. Le tableau V (p.106) indique la composition en amino-acides de ces fractions que nous avons nommées Pn-T1 et Pn-T2 en fonction de leur ordre d'élution.

La composition du peptide Pn-T1 correspond exactement à celle des 9 premiers résidus du peptide Pn-SP. Le peptide Pn-T2 est particulièrement intéressant dans la mesure où il contient de la thréonine, de l'acide glutamique et de la leucine comme le peptide Pn-SP. Or ces acides aminés n'ont pas été retrouvés dans le début de la séquence déterminée pour ce peptide.

Nous avons soumis le peptide Pn-T2 à la dégradation manuelle de EDMAN et avons trouvé le résultat suivant :

Lys-Pro-Ala-Gly-Pro- ? -Ala-Thr-Glu-(Ser,Val,Leu)

Nous n'avons pu identifier avec certitude le PTH-AA formé au cours du 6ème cycle de cette dégradation.

La séquence NH₂-terminale du peptide Pn-T2 recouvre la séquence COOH-terminale du peptide Pn-SP et ceci nous permet de proposer pour le peptide Pn le début de séquence en acides aminés suivant :

Pro-Ala-Val-Ser-Ala-Pro-Gly-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-
Lys-Lys-Ala-Ala-Gly-Gly-Ala-Lys-Val-Arg-^{Lys}Arg-Pro-Ala-Gly-Pro-
? -Ala-Thr-Glu-

TABLEAU VI
DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN DU PEPTIDE Pn-SP

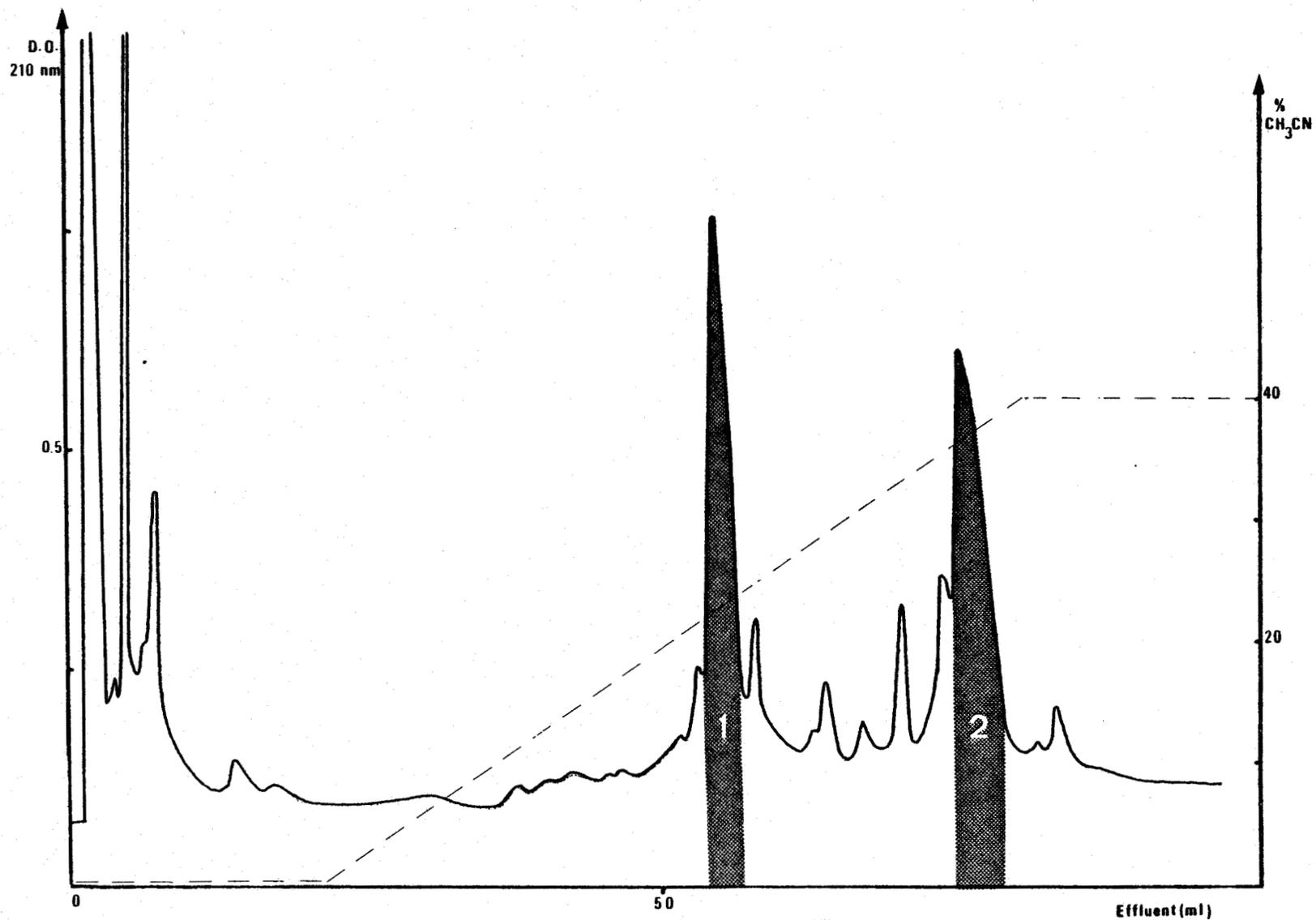
Cycle	Résidu	Quantité en nM	Détermination
1	Pro	168.4	HPLC
2	Ala	70.2	HPLC - GC
3	Val	112.6	HPLC - GC
4	Ser	11.3	HPLC
5	Ala	60.5	HPLC
6	Pro	89.9	HPLC
7	Gly	47.2	HPLC
8	Ala	50.4	HPLC
9	Lys	35.1	HPLC
10	Ala	44.3	HPLC
11	Ala	42.2	HPLC
12	Ala	40.9	HPLC
13	Lys	17.8	HPLC
14	Lys	25.8	HPLC
15	Pro	34.8	HPLC
16	Lys	15.3	HPLC
17	Lys	17.9	HPLC
18	Ala	11.8	HPLC
19	Ala	15.6	HPLC
20	Gly	9.2	HPLC
21	Gly	10.9	HPLC
22	Ala	7.9	HPLC
23	Lys	4.4	HPLC
24	Val	29.4	HPLC - GC
25	Arg	5.3	HPLC
26	Arg/Lys	5.2/3.2	HPLC
27	Pro	1.1	HPLC
28	?	-	-
29	Gly	0.4	HPLC
30	Pro	1.0	HPLC

Détermination de la nature du PTH-AA en :

HPLC : Chromatographie liquide à haute pression

GC : Chromatographie en phase gazeuse





BUS
LILLE

FIGURE 17 Séparation des peptides Pn-T1 et Pn-T2 en HPLC. Colonne micro-Bondapak C₁₈ (0.39x30cm). Débit 2 ml/min. éluée par un gradient linéaire (---) de 0 à 40 p.100 d'acétonitrile dans le TFA 0.05 p.100. Les fractions hachurées correspondent aux peptides Pn-T1 et Pn-T2.

Le peptide Pn-T2, majeur dans l'hydrolysate tryptique de Pn, possède une lysine NH₂-terminale. Nous pensons donc que cet acide aminé est prépondérant en position 26 du peptide Pn.

Cette microhétérogénéité identifiée en position 26 du peptide Pn reflète l'existence d'un variant de l'histone H1E. Cette remarque pourrait être corrélée avec l'observation d'une hétérogénéité électrophorétique de l'histone H1E (Figure 14, couloir 9, p.89).

Nous pouvons corréler, par analogie, la séquence du peptide Pn avec la séquence 10 à 43 de RTL-3 (Figure 20, p.123).

3 - Etude de la fraction 14

La fraction 14 de la figure 15a (p.102) qui présente une densité optique notable à 274,5 nm, renferme des peptides courts car son volume d'élution de la colonne de Sephadex est élevé.

Ces peptides ont été séparés par HPLC. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 18. Une première analyse nous a conduits à écarter plusieurs fractions hétérogènes ou représentant des quantités de peptide trop faibles.

Les fractions auxquelles nous nous sommes intéressés sont numérotées, de 1 à 9, dans leur ordre d'élution. Ces fractions ont été soumises à une analyse d'acides aminés dont le résultat figure dans le tableau VII.

Certains résultats de ce tableau sont corrigés d'après les données de la séquence. Nous pensons que l'excès d'alanine dans la fraction 1 et l'excès de sérine dans la fraction 8 sont dûs à une contamination des peptides analysés par des fractions voisines. Toutefois nous n'avons pu expliquer le défaut d'acide aspartique constaté dans les fractions 1 et 9.

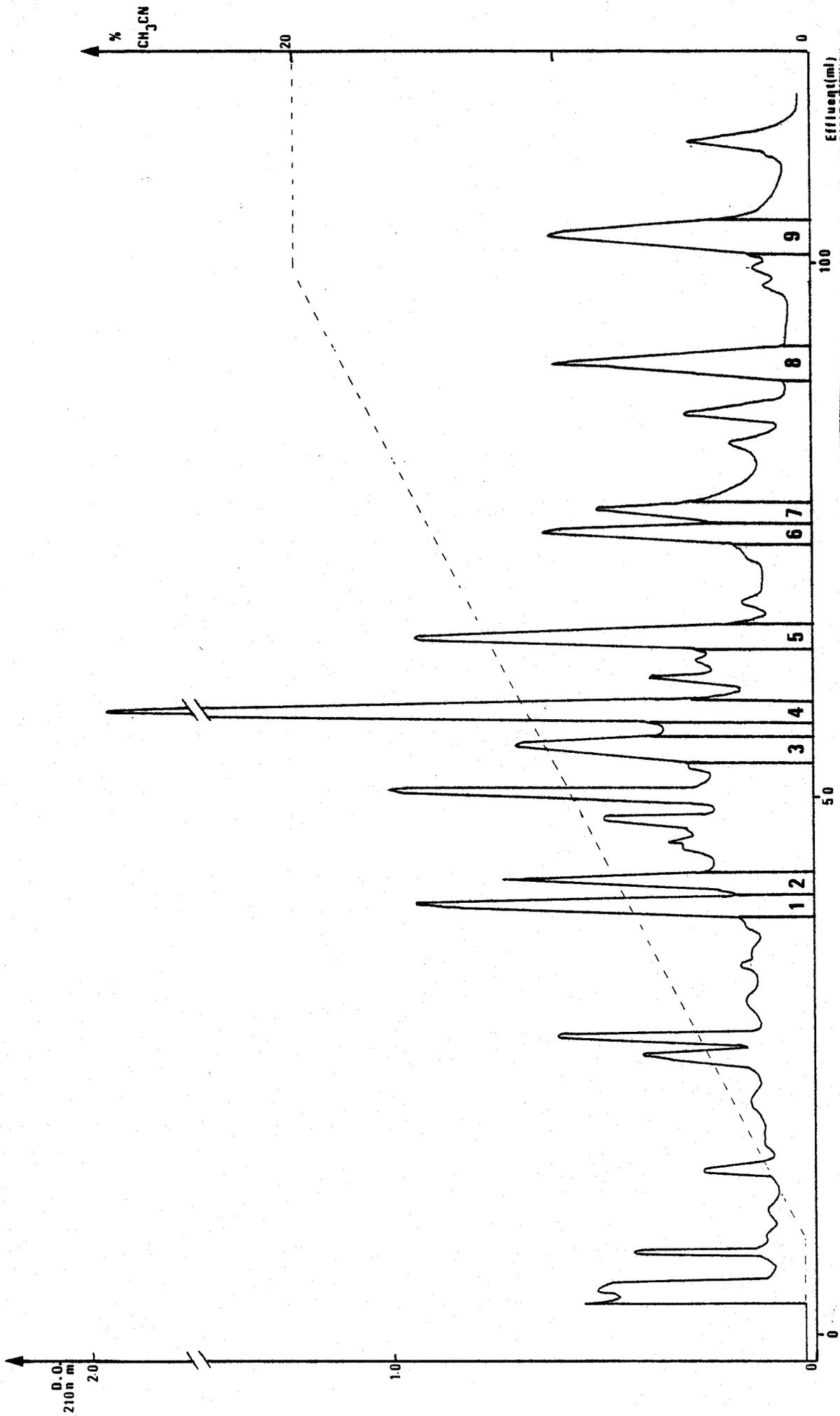


FIGURE 18 Séparation des peptides pepsiques de la fraction 14 (Figure 15) en HPLC. Colonne micro-Bondapak C₁₈ (0.39x30cm) éluée par un gradient linéaire (---) de 0 à 20 p.100 d'acétonitrile dans le TFA 0.05 p.100 - Débit 2 ml/minute. Seules les fractions numérotées ont été utilisées.

TABLEAU VII

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES PEPSIQUES SEPARÉS EN HPLC (FIGURE 18)

Fraction	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acides aminés									
Acide aspartique	2.0(3)*	-	-	-	-	-	-	-	1.6(3)*
Thréonine	-	1.0(1)	1.6(2)	1.8(2)	-	0.9(1)	-	-	-
Sérine	1.3(1)	1.0(1)	1.8(2)	1.7(2)	-	1.9(2)	2.6(3)	1.0(0)*	1.0(1)
Acide glutamique	1.0(1)	-	1.0(1)	1.0(1)	-	-	1.1(1)	-	0.7(1)
Proline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycine	-	1.1(1)	2.8(3)	2.9(3)	2.0(2)	1.4(1)	1.7(2)	2.0(2)	2.2(2)
Alanine	1.0(0)*	-	1.7(2)	1.1(1)	5.0(5)	-	0.9(1)	4.8(5)	0.5(1)
Valine	1.0(1)	0.9(1)	0.9(1)	0.8(1)	-	0.8(1)	-	-	1.6(2)
Isoleucine	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0(4)
Leucine	-	0.9(1)	-	-	1.7(2)	1.8(2)	2.4(2)	2.0(2)	-
Tyrosine	0.7(1)	-	-	-	-	-	-	0.7(1)	-
Phénylalanine	-	-	0.7(1)	0.9(1)	-	-	-	-	-
Lysine	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.8(2)	2.0(2)	2.0(2)	2.0(2)	2.2(2)
Arginine	-	-	-	-	-	-	1.0(1)	-	1.6(2)
Total	8	6	13	12	11	9	12	12	18
Quantité en nM	35	140	60	150	150	35	90	65	20

* Ces valeurs ont été corrigées d'après les données de la séquence.

Les résultats sont donnés en nombre de résidus par mole de peptide. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.



Ces peptides sont caractérisés par un taux élevé d'acides aminés hydrophobes, un taux très faible d'acides aminés basiques, une absence totale de proline et pour certains d'entre eux la présence d'acides aminés aromatiques.

Ces caractéristiques témoignent sans équivoque de l'origine de ces peptides, issus de la zone centrale globulaire de l'histone H1E.

Les peptides des fractions 4 et 5 (Figure 18) ont été soumis à la dégradation automatique de EDMAN ; les autres peptides ont été dégradés manuellement (Tableau VIII).

Certains peptides du tableau VIII présentent des analogies de structure primaire qui nous ont permis de les regrouper pour obtenir la structure de 4 peptides, qui ont été nommés Pg, et numérotés de 1 à 4 en fonction de leur position dans la séquence de l'histone H1E par analogie avec la structure primaire de RTL-3 (voir aussi Figure 20 p.123).

Pg1 : Ala-Lys-Glu-Arg-
└──────────┘
7

Pg2 : Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Gly-Tyr-Asp-Val-
└──────────┘
5 8
 Glu-Lys-Asn-Asn-Ser-
└──────────┘
9

Pg3 : Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Lys-Gly-(Thr,Leu)
└──────────┘
6 2

Pg4 : Val-Gln-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe
└──────────┘
3 4

TABLEAU VIII

RESULTATS DE LA DEGRADATION DE EDMAN DES PEPTIDES PEPSIQUES DE
L'HISTONE H1E (Figure 18).

Peptide (Nomenclature de la Fig.18)	Séquence déterminée
1	Tyr-Asp-Val-Glu-Lys-Asn-Asn-Ser
9	Asp-Val-Glu-Lys-Asn-(Asp,Ser,Gly ₂ ,Ala,Val,Ile ₄ ,Lys,Arg)
8	Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Gly-Tyr
5	Ala-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Leu-Ala-Ala-Gly-Gly
3	Val-Gln-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-(Ser ₂ ,Gly,Ala,Phe)
4	Val-Gln-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe
2	Val-Ser-Lys-Gly-(Thr,Leu)
6	Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Lys-Gly-(Thr,Leu)
7	Ala-Lys-Glu-Arg-(Ser ₃ ,Gly ₂ ,Leu ₂ ,Lys)

Ces peptides ont été rassemblés en fonction de leur analogie de séquence

B - COUPURE DE L'HISTONE H1E PAR L'ACIDE ACETIQUE 0.25M

La composition en amino-acides de l'histone H1E révèle que celle-ci contient 4 résidus d'acide aspartique. Trois de ces résidus sont présents dans le peptide Pg2, l'un sous forme aspartate, les deux autres sous forme amide. Le quatrième résidu d'acide aspartique n'a pas encore été identifié. Ces résultats nous ont donc incités à hydrolyser l'histone H1E par l'acide acétique dilué pour obtenir une coupure spécifique de l'unique liaison aspartyle (ou des deux liaisons aspartyles) présente (s) dans la protéine.

Nous avons choisi un temps court d'hydrolyse (15 heures) afin d'éviter la désamidation des résidus d'asparagine.

20 mg d'histone H1E ont ainsi été hydrolysés par l'acide acétique 0.25M.

L'hydrolysat a été fractionné sur Sephadex G100 ; le chromatogramme correspondant est reproduit dans la figure 19a. L'analyse électrophorétique des fractions obtenues est présentée dans la figure 19b.

Nous nous sommes intéressés tout d'abord à la fraction 1 de la figure 19 qui apparaît homogène en gel de polyacrylamide. La composition en acides aminés du peptide contenu dans cette fraction est reportée dans le tableau IX.

Ce peptide se caractérise par sa grande taille (124 résidus calculés) et sa richesse en alanine, proline et lysine. D'autre part ce peptide contient 2 résidus d'acide aspartique et un résidu de phénylalanine mais ne contient pas de tyrosine.

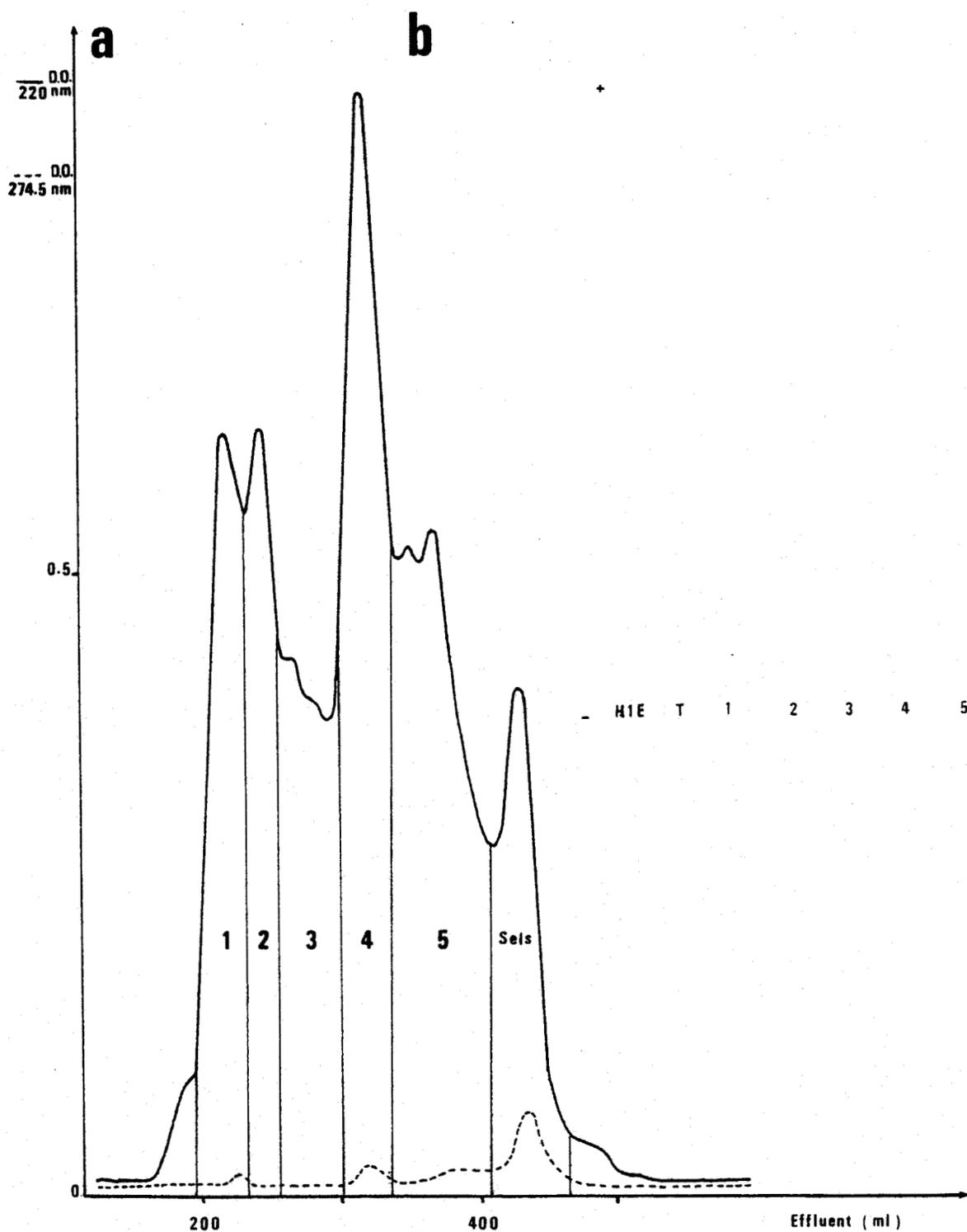


FIGURE 19 Fractionnement de l'hydrolysate acétique de l'histone H1E.

- a Chromatographie de gel filtration sur Sephadex G100 super-fine. Colonne 100x2.5cm - Débit 9 ml/heure. Collection 30'
- b Electrophorèse en gel de polyacrylamide. Acrylamide 17 p.100, urée 2.5M/acide acétique 0.9M, pH 2.7. 1 heure de migration à 22 mA.
T : hydrolysate acétique total.

TABLEAU IX

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DU PEPTIDE DE LA FRACTION 1 (Fig.19)

	Fraction 1 Figure 19		Histone H1E
Acide aspartique	2.2	(2)	4
Thréonine	6.5	(7)	11
Sérine	7.8	(8)	15
Acide glutamique	3.3	(3)	7-8
Proline	11.7	(18)	20
Glycine	6.5	(7)	14
Alanine	32.0	(32)	58
Valine	3.9	(4)	9-10
Isoleucine	0.7	(1)	2
Leucine	3.9	(4)	10
Tyrosine	0		1
Phénylalanine	0.9	(1)	1
Lysine	41.1	(41)	62
Arginine	1.8	(2)	5
Total	124		219-221
Quantité de protides	120 nM recueillies		830 nM hydrolysées

Les résultats sont présentés en nombre de résidus par mole de peptide. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.

Les données de structure primaire fournies par les peptides peptiques (voir figure 20) nous indiquent que ce peptide est bien le peptide COOH-terminal issu de la coupure par l'acide acétique de la liaison aspartyle identifiée dans le peptide Pg2 et localisée dans la séquence de H1E immédiatement après le résidu de tyrosine. Nous avons nommé ce peptide Ac2 en supposant, compte tenu de sa taille, que la molécule d'histone H1E avait été coupée en deux peptides : Ac1, NH₂-terminal et Ac2, COOH-terminal.

Le fragment Ac1 n'a pas encore été purifié ; il est probablement contenu dans la fraction 4 (Figure 19) qui absorbe à 274.5 nm. Pour la suite de nos travaux ce fragment nous servira à compléter la séquence NH₂-terminale de l'histone H1E.

L'étude structurale de ce fragment dont l'extrémité NH₂-terminale est bloquée (vraisemblablement par acétylation, par comparaison avec les histones H1 connues) ne pourra être réalisée qu'à partir de peptides obtenus par coupures enzymatiques de ce fragment.

Le peptide Ac2 a été soumis à la dégradation automatique de EDMAN dont les résultats figurent dans le tableau X et ci-dessous :

Val-Glu-Lys-Asn-Asn-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Gly-Leu-Lys-Ser-Leu-Val

Malheureusement, après le 16ème cycle de dégradation toute détermination a été rendue impossible par l'apparition d'un "bruit de fond" de PTH-lysine, PTH-alanine et PTH-proline, dû sans doute à des coupures de la chaîne protéique sous l'action de l'acide heptafluorobutyrique utilisé lors de l'étape de clivage de la thiazolinone formée dans la dégradation de EDMAN.

TABLEAU X

DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN DU PEPTIDE Ac2

Cycle	Résidu	Quantité en nM	Détermination
1	Val	16	HPLC-GC
2	Glu	28	HPLC
3	Lys	22	HPLC
4	Asn	17.8	HPLC
5	Asn	21.2	HPLC
6	Ser	n.q	HPLC
7	Arg	15.6	HPLC
8	Ile	6.0	HPLC-GC
9	Lys	9.4	HPLC
10	Leu	4.0	HPLC
11	Gly	5.1	HPLC
12	Leu	n.q	HPLC
13	Lys	1.2	HPLC
14	Ser	n.q	HPLC
15	Leu	n.q	HPLC
16	Val	n.q	HPLC-GC

Détermination de la nature du PTH-AA en :

HPLC : Chromatographie liquide à haute pression

GC : Chromatographie en phase gazeuse

n.q = PTH-AA identifiée avec certitude mais non quantifiée



- Le résultat obtenu nous permet toutefois de constater
- d'une part que les 6 premiers résidus du peptide Ac2 correspondent aux 6 derniers résidus du peptide Pg2 ;
 - d'autre part que la séquence 13-16 du peptide Ac2 recouvre les 4 premiers résidus du peptide Pg3.

Cette séquence NH₂-terminale du peptide Ac2 nous permet donc d'établir un recouvrement entre les peptides Pg2 et Pg3, de structure connue et de connaître la structure primaire de 32 résidus de la zone centrale globulaire de l'histone H1E d'érythrocyte de Poulet comme nous pouvons le voir dans la figure 20.

Nous avons regroupés dans cette dernière figure tous les peptides dont nous avons déterminé la structure primaire et les avons replacés dans la séquence en acides aminés de l'histone H1E par analogie avec la séquence des 106 premiers résidus de la sous-fraction 3 de l'histone H1 de thymus de Lapin.

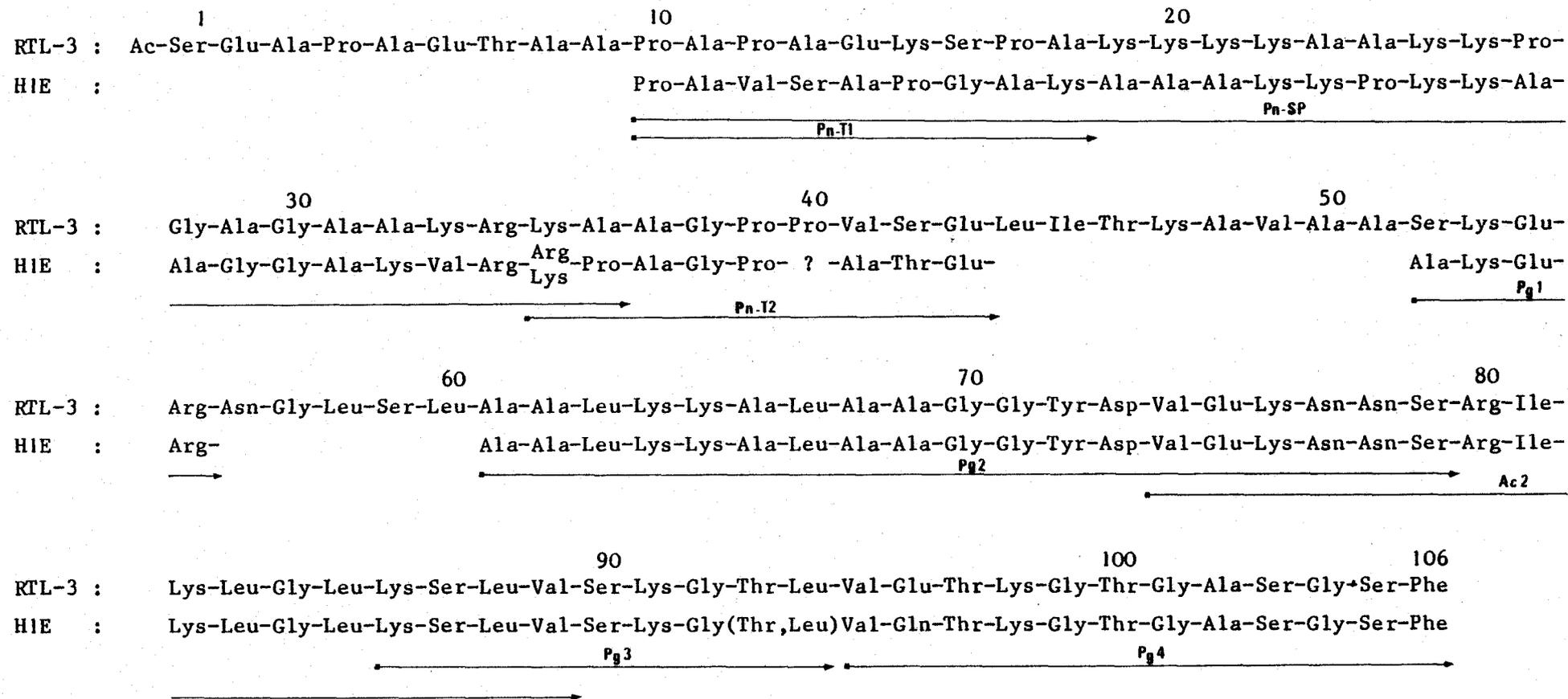


FIGURE 20

Positionnement des séquences déterminées pour les peptides Pn-SP, Pn-T1, Pn-T2, Pg1, Pg2, Pg3, Pg4 et Ac2 dans la structure primaire de l'histone H1E d'érythrocyte de Poulet par analogie avec la séquence des 106 premiers résidus de RTL-3.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons séparé et caractérisé cinq des sous-fractions de l'histone H1 d'érythrocyte de Poulet. La technique de chromatographie d'échange d'ions que nous avons développée ne nous permet certes pas de préparer de très grandes quantités de chacune de ces histones mais nous pensons pouvoir affiner encore les séparations obtenues.

A l'heure actuelle, la plupart des travaux visant à définir le rôle de l'histone H1 dans la structure et la fonction de la chromatine ont été menés en considérant l'ensemble des sous-types de cette molécule. Nous pouvons maintenant envisager de définir le rôle exact de chaque sous-fraction.

D'autre part nous avons entrepris l'étude structurale de la sous-fraction H1E qui est la plus basique parmi les sous-fractions de H1 caractérisées dans l'érythrocyte de Poulet.

Nos travaux nous ont permis de déterminer une partie de la séquence NH_2 -terminale et une partie de la séquence de la zone centrale de la molécule. Nous pouvons constater que la structure primaire de cette zone centrale est très peu différente de la séquence correspondante de la sous-fraction 3 d'histone H1 de thymus de Lapin (RTL-3). Ceci confirme le fait que cette partie de la molécule d'histone H1 est très conservée quels que soient l'espèce, le tissu ou la sous-fraction considérés. Les peptides isolés de la zone NH_2 -terminale de

l'histone H1E sont par contre sensiblement différents des peptides correspondants de RTL-3. Nous n'avons pas encore d'informations sur la structure primaire de la zone COOH-terminale de la molécule.

L'étude de cette protéine présente un grand nombre de difficultés liées à la quantité importante de résidus de lysine, d'alanine et de proline dans la structure de l'histone H1E. Notre but est de déterminer la structure primaire complète de cette histone, dans un premier temps et d'aborder par la suite l'étude structurale des autres histones H1 de l'érythrocyte de Poulet. Nous pourrions ainsi établir une corrélation entre la fonction de chacune de ces histones et sa structure particulière.

BIBLIOGRAPHIE DE LA DEUXIEME PARTIE

- | | Pages |
|---|--------------|
| <p>1 - BATES, D.L., BUTLER, P.J.G., PEARSON, E.C. and THOMAS, J.O. (1981)</p> <p style="padding-left: 40px;">Stability of the higher-order structure of chicken erythrocyte chromatin in solution.</p> <p style="padding-left: 40px;"><u>Eur.J.Biochem.</u>, <u>119</u>, 469-476.</p> | 80 |
| <p>2 - BRIAND, G., KMIECIK, D., SAUTIERE, P., WOUTERS, D. BORIE-LOY, O., BISERTE, G., MAZEN, A. and CHAMPAGNE, M. (1980)</p> <p style="padding-left: 40px;">Chicken erythrocyte histone H5.IV - Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence.</p> <p style="padding-left: 40px;"><u>FEBS Letters</u>, <u>112</u>, 147-151.</p> | 94, 103, 105 |
| <p>3 - CHAMPAGNE, M. and MAZEN, A. (1967)</p> <p style="padding-left: 40px;">Isolement et caractérisation d'une fraction d'histone spécifique des érythrocytes de Poulets.</p> <p style="padding-left: 40px;"><u>C.R.Acad.Sci.Paris</u>, <u>265</u>, 2100-2103.</p> | 73, 75 |
| <p>4 - CHAMPAGNE, M., MAZEN, A. and WILHELM, X. (1968)</p> <p style="padding-left: 40px;">Histones d'érythrocytes de Poulets. I - Fractionnement des histones totales et isolement d'une histone spécifique.</p> <p style="padding-left: 40px;"><u>Bull.Soc.Chim.Biol.</u>, <u>50</u>, 1261-1272.</p> | 73, 74 |
| <p>5 - CHANG, J.Y., BRAUER, D. and WITTMAN-LIEBOLD, B. (1978)</p> <p style="padding-left: 40px;">Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N,N dimethyl-aminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method.</p> <p style="padding-left: 40px;"><u>FEBS Letters</u>, <u>93</u>, 205-214.</p> | 99 |

- 6 - COLE, R.D. (1977) 95, 103
 Special features of the structures of H1 histones.
 in The molecular biology of the mammalian genetic apparatus, 1, 93-104. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New-York, Oxford.
- 7 - EDMAN, P. (1956) 99
 On the mechanism of the phenylisothiocyanate degradation of peptides.
Acta Chem.Scand., 10, 761-768.
- 8 - HERMANN, J., TITANI, K., ERICSSON, L.H., WADE, R.D., NEURATH, H. and WALSH, K.A. (1978) 99
 Amino acid sequence of two cyanogen bromide fragment of glycogene phosphorylase.
Biochemistry, 17, 5672-5679.
- 9 - HOHMANN, P. (1980) 77
 Species- and cell-specific expression of H1 histones in tissue culture cells.
Arch.Biochem.Biophys., 205, 198-209.
- 10 - HOUMARD, J. and DRAPEAU, G.R. (1972) 107
 Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 69, 3506-3509.
- 11 - KLAPPER, D.G., WILDE, C.E. and CAPRA, J.D. (1978) 100
 Automated-amino acid sequence of small peptides utilizing polybrene.
Anal.Biochem., 85, 126-131.
- 12 - PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969) 76, 78, 82, 87, 98
 High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.
Arch.Biochem.Biophys., 130, 337-346.

- 13 - PISANO, J.J. and BRONZERT, T.J. (1969) 99
Analysis of amino-acid phenylthiohydantoins by gas chromatography.
J.Biol.Chem., 244, 5597-5607.
- 14 - TARR, G.E., BEECHER, J.F., BELL, M. and MAC KEAW, D. 100
(1978)
Polyquaternary amines prevent peptide.
Anal.Biochem., 84, 622-627.
- 15 - ZWEIDLER, A. (1978) 78,88
Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of non-ionic detergents.
in Methods in Cell Biology, 17, 223-233.
Ed. STEIN, G., STEIN, J. and KLEINSMITH, L.J.
Acad. Press, New-York.



RESUME

Au sein de la chromatine l'histone H1 joue un rôle particulier de stabilisation et peut-être de régulation des différents niveaux d'organisation du DNA que ce soit dans le nucléosome ou dans les structures d'ordre supérieur.

La séparation des sous-fractions de l'histone H1 d'érythrocyte de Poulet et l'étude de leur structure primaire ont été entreprises dans le but de préciser le rôle exact de chacune d'elles.

Ce travail décrit la séparation en chromatographie d'échange d'ions de cinq de ces sous-fractions nommées H1A, H1B, H1C, H1D et H1E qui ont pu être caractérisées par leur migration électrophorétique et leur composition en amino-acides.

L'étude structurale de la sous-fraction la plus basique, H1E, a été entreprise et la séquence en acides aminés de plusieurs peptides de cette histone a été déterminée.

Ces peptides sont situés d'une part, dans la zone NH₂-terminale dont nous connaissons maintenant 34 résidus et d'autre part, dans la partie centrale hydrophobe de la molécule, dont nous connaissons 46 résidus.

Les résultats acquis nous permettent d'affirmer que la zone centrale globulaire de l'histone H1E présente un remarquable degré de conservation alors que la zone NH₂-terminale est assez différente des séquences d'histones H1 connues.

La purification de chacune des sous-fractions d'histone H1 d'érythrocyte de Poulet et l'élucidation de la structure primaire d'au moins l'une d'entre elles permettront de s'appuyer sur des données structurales précises pour développer la connaissance de la fonction exacte de ces protéines au sein du noyau.

MOTS-CLEFS

CHROMATINE/NUCLEOPROTEINES/HISTONE H1/ ERYTHROCYTE ■ POULET