

Numéro d'ordre : 610

50376
1984
32

50376
1984
32

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

THESE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES
option BIOCHIMIE

par

ARLETTE MARTINAGE

HISTONES H2A ET H2B DE GONADES D'ETOILE DE MER
STRUCTURE PRIMAIRE
PHOSPHORYLATION DES HISTONES LIBRES OU ASSOCIEES AU DNA



présentée le 29 MAI 1984 devant la Commission d'Examen

Président	Professeur J.MONTREUIL
Rapporteurs	Professeur J.KREMBEL Professeur G.MARCHIS-MOUREN Docteur P.SAUTIERE
Examineurs	Professeur G.BISERTE Docteur M.CHAMPAGNE Professeur J.DEMAILLE

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 FERRET, 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. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
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. 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. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
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. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
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. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques

M. WALLART Francis
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN Justin Nicole

Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie inorganique
Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

Merci, du fond du coeur, à ma Famille, à mes Maîtres de Biochimie, à mes Juges, à tous ceux qui m'ont aidée par leur travail, leurs conseils, leurs critiques et leur présence amicale.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire des Protéines Nucléaires de l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses (Unité 124 de l'INSERM) et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur Gérard BISERTE) sous la direction scientifique du Docteur Pierre SAUTIERE, Maître de Recherches au CNRS.

Nos recherches ont bénéficié de l'aide de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (contrat n°77.5.048.2) et des contrats ATP Chromatine n°2875 et 4206 du Centre National de la Recherche Scientifique.

Elles ont fait l'objet :

- du D.E.A. de Thierry DUPRESSOIR

Contribution à l'étude de la structure primaire de l'histone H2A d'Etoile de mer : *Asterias rubens*.
Lille 1979.

- des publications suivantes :

Amino acid sequence of rat thymus histone H2B and identification of the *in vitro* phosphorylation sites.
A.MARTINAGE, P.MANGEAT, P.SAUTIERE, G.MARCHIS-MOUREN and G.BISERTE (1979)
Biochimie, 61, 61-69.

In vitro phosphorylation of histones H5, H2A, H2B and of the dimer H2A-H2B by a cyclic AMP-dependent protein kinase from rat pancreas.
A.MARTINAGE, P.MANGEAT, B.LAINE, M.COUPPEZ, P.SAUTIERE, G.MARCHIS-MOUREN and G.BISERTE (1980)
FEBS Letters, 118, 323-329.

Phosphorylated sites of chicken erythrocyte histone H5 by a cyclic AMP-independent protein kinase from mouse plasmocytoma cells.
A.MARTINAGE, C.QUIRIN-STRICKER, M.CHAMPAGNE and P.SAUTIERE (1981)
FEBS Letters, 134, 103-106.

Study of *in vitro* phosphorylation of histones H3, H4 and of the non-acetylated and acetylated tetramers (H3-H4)₂.
A.MARTINAGE, P.MANGEAT, P.SAUTIERE, M.COUPPEZ, G.MARCHIS-MOUREN and G.BISERTE (1981)
FEBS Letters, 134, 107-110.

Primary structure of histone H2A from gonads of the starfish *Asterias rubens*.
A.MARTINAGE, D.BELAÏCHE, T.DUPRESSOIR and P.SAUTIERE (1983)
Eur.J.Biochem., 130, 465-472.

Primary structure of histone H2B from gonads of the starfish *Asterias rubens*.
A.MARTINAGE, G.BRIAND, A.VAN DORSSELAER, C.CRANE-ROBINSON and P.SAUTIERE
(manuscrit en préparation)

Ce travail a également fait l'objet des communications suivantes orale ou par poster :

Studies on the phosphorylation of rat thymus H2B histone by the cyclic AMP-dependent protein kinase from Rat pancreas.

P.MANGEAT, A.MARTINAGE, H.CHAHINIAN, P.SAUTIERE and G.MARCHIS-MOUREN
11th FEBS-Meeting, Copenhagen (1977)

Détermination des sites de phosphorylation dans les histones H2B et H2A de Rat.

A.MARTINAGE, B.LAINE, P.SAUTIERE, P.MANGEAT, G.MARCHIS-MOUREN

lère réunion du groupe thématique "Phosphorylation des protéines" Carry le Rouet (1978)

Phosphorylation des histones H2A, H2B et H5.

A.MARTINAGE, P.MANGEAT, B.LAINE, P.SAUTIERE et G.MARCHIS-MOUREN

Forum des Jeunes, Villeneuve d'Ascq (1978)

Sites of *in vitro* phosphorylation in histone H5, H2A, H2B and in the dimer H2A-H2B.

A.MARTINAGE, P.SAUTIERE, P.MANGEAT and G.MARCHIS-MOUREN
FMI-EMBO Workshop on Protein phosphorylation and Bio-regulation, BALE (1979)

Sites of *in vitro* phosphorylation in calf histone H3 and in the tetramer (H3-H4)₂

A.MARTINAGE, M.COUPPEZ, P.SAUTIERE, P.MANGEAT and G.MARCHIS-MOUREN

EMBO Workshop on Phosphorylation of Proteins and Genetic Expression, Villejuif (1981)

Structural variations of histone H2A during evolution.

D.KMIECIK, D.WOUTERS, B.LAINE, A.MARTINAGE, M.COUPPEZ and P.SAUTIERE

Réunion commune des Sociétés de Chimie Biologique Française, Suisse et Allemande ; STRASBOURG, 1981

Phosphorylation des histones et modification de la structure de la chromatine.

A.MAZEN, S.MULLER, A.MARTINAGE, M.CHAMPAGNE, G.MARCHIS-MOUREN and P.SAUTIERE

Congrès de printemps de la Société de Chimie Biologique "Médiateurs intracellulaires et phosphorylation des protéines". La Grande Motte, 1983

Depuis 1981, une thématique nouvelle a été développée au laboratoire en collaboration avec P.CHEVAILLIER (Biologie Cellulaire, Créteil) et M.LOIR (INRA, Rennes). Cette thématique concerne l'organisation de la chromatine au cours de la différenciation du gamète mâle. L'objectif en est l'étude des protéines nucléaires du spermatozoïde et de leur évolution au cours de la gamétogénèse. Chez les vertébrés au cours de la gamétogénèse mâle, les histones somatiques sont remplacées par des protamines soit directement, soit après mise en place transitoire de protéines intermédiaires spécifiques des spermatozoïdes. Ces recherches bénéficient de l'aide DGRST 82E 1152 et d'une RCP CNRS 08 06 80.

Mon activité dans ce domaine concerne l'étude de la structure primaire et des modifications post-synthétiques (en particulier, la phosphorylation) des protéines au cours de la spermatogénèse chez un poisson (la Roussette) et chez un mammifère (le Bélier).

Ce travail fait l'objet des publications suivantes :

- Primary structure of Scylliorhinine S4, a protamine isolated from sperm nuclei of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. P.SAUTIERE, M.GUSSE, G.BRIAND, A.MARTINAGE & P.CHEVAILLIER. FEBS Letters, 1984, soumis pour publication.
- Primary structure of the ram (*Ovisaries*) protamine. P.SAUTIERE, D.BELAÏCHE, A.MARTINAGE & M.LOIR. Eur.J.Biochem., 1984, soumis pour publication.

et de la communication :

- Nuclear events occurring during the dog-fish spermiogenesis. M.CHAUVIERE, M.GUSSE, B.LAINE, J.ALTERIO, P.SAUTIERE, A.MARTINAGE & P.CHEVAILLIER. Congrès de Biologie Cellulaire, Paris, Juillet 1982.

Je prie mes lecteurs de bien vouloir me pardonner l'emploi, tout au long de ma thèse, des mots anglais "core particle" et "DNA linker" dont aucune traduction française n'a jamais été vraiment mise au point ni utilisée.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>CHAPITRE I</u>	
<u>INTRODUCTION</u>	1
I - 1 <u>CONSTITUTION DE LA CHROMATINE</u>	3
I - 2 <u>ORGANISATION DE LA CHROMATINE</u>	5
I - 2-1 Nucléosome et "core particle"	5
I - 2-2 Forme et dimensions de la "core particle"	8
I - 2-3 Rôle structural des histones	9
I - 2-3-1 Caractéristiques structurales des histones	10
I - 2-3-2 Interactions histone-histone	13
I - 2-3-3 Organisation des histones dans le nucléosome	16
I - 2-4 Superstructure de la chromatine	20
I - 2-5 Protéines non-histones	23
I - 2-5-1 Caractéristiques générales des protéines HMG	23
I - 2-5-2 Interactions protéines HMG-DNA	24
I - 2-6 La chromatine active	27

CHAPITRE II

MODIFICATIONS POST-SYNTHETIQUES DES PROTEINES DE LA	33
<u>CHROMATINE</u>	
II - 1 <u>ACETYLATION</u>	36
II - 1-1 L'acétylation : modification enzymatique des protéines	36
II - 1-2 Localisation des sites d'acétylation	38
II - 1-3 Effets du butyrate sur l'acétylation	40
II - 1-4 Effets de l'acétylation sur la struc- ture de la chromatine	42
II - 1-5 Acétylation et transcription	44
II - 1-6 L'acétylation au cours du cycle cel- laire	47
II - 2 <u>PHOSPHORYLATION : VOIE MAJEURE DU CONTROLE DES</u> <u>ACTIVITES CELLULAIRES</u>	50
II - 2-1 Protéines kinases : diversité et spécificité	51
- Protéines kinases activées par les nucléotides cycliques	52
- Protéines kinases non activées par les nucléotides cycliques	56
II - 2-2 La phosphorylation au cours du cycle cellulaire	61
II - 2-3 Importance de la phosphorylation dans la structure de la chromatine	66
II - 2-4 Relation phosphorylation-acétylation	70
II - 2-5 Phosphorylation de la tyrosine : nouveau type de modification des protéines	73

II - 3	<u>METHYLATION</u>	77
II - 4	<u>ADP-RIBOSYLATION</u>	79
II - 4-1	Généralités	79
II - 4-2	Protéines ADP-ribosylées	81
II - 4-3	Importance de l'ADP-ribosylation dans la structure de la chromatine	85
II - 5	<u>UBIQUITINATION</u>	88
	<u>BIBLIOGRAPHIE DES CHAPITRES I ET II</u>	90

CHAPITRE III

	<u>ETUDES STRUCTURALES : HISTONES H2A ET H2B DE GONADES D'ETOILE DE MER, ELEMENTS D'UN DIMERE CONSTITUTIF DU NUCLEOSOME</u>	116
III - 1	<u>CHOIX DU MATERIEL D'ETUDE</u>	118
III - 2	<u>STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B D'ETOILE DE MER</u>	123
	<i>PUBLICATION N°1</i>	126
	<i>PUBLICATION N°2</i>	134

CHAPITRE IV

	<u>ETUDE DES SITES DE PHOSPHORYLATION DANS LES HISTONES INDIVIDUELLES ET LES COMPLEXES D'HISTONES</u>	166
IV - 1	<u>PHOSPHORYLATION DES HISTONES ET DES COMPLEXES D'HISTONES PAR UNE KINASE DEPENDANTE DE L'AMP CYCLIQUE</u>	168

IV - 1-1	Identification des sites de phosphorylation dans l'histone H2B	169
<i>PUBLICATION N°3</i>		171
IV - 1-2	Phosphorylation des histones individuelles H5, H2A et du dimère H2A-H2B	182
<i>PUBLICATION N°4</i>		184
IV - 1-3	Phosphorylation des histones H3,H4. Importance de l'interaction des histones H3 et H4: phosphorylation des tétramères (H3-H4) ₂ non acétylé et acétylé	193
<i>PUBLICATION N°5</i>		195
IV - 2	<u>PHOSPHORYLATION DE L'HISTONE H5 PAR UNE KINASE INDEPENDANTE DE L'AMP CYCLIQUE</u>	202
<i>PUBLICATION N°6</i>		204
 <u>CHAPITRE V</u> 		
<u>PHOSPHORYLATION DE LA "CORE PARTICLE" ET DE LA CHROMATINE</u>		210
V - 1	<u>PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE</u>	213
V - 2	<u>PHOSPHORYLATION EN PRESENCE D'UNE KINASE ACTIVEE PAR L'AMP CYCLIQUE</u>	216
V - 3	<u>IDENTIFICATION DES HISTONES PHOSPHORYLEES</u>	220
V - 4	<u>INFLUENCE DE LA PHOSPHORYLATION SUR LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE : CONTROLES IMMUNOCHIMIQUES ET OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE</u>	224
<u>CONCLUSION</u>		227
<u>BIBLIOGRAPHIE DES CHAPITRES III,IV ET V</u>		231

ABREVIATIONS UTILISEES

ADP-R	: Adénosine diphospho-ribose
AMP	: Adénosine -5'-monophosphate
ATP	: Adenosine -5'-triphosphate
CHO	: Chinese Hamster Ovary
DNA	: Acide desoxyribonucléique
DNase	: Desoxyribonucléase
EAT	: Ehrlich Ascites Tumors
EDTA	: Ethylènediamine tetraacetic acid
EGF	: Epidermal Growth Factor
GMP	: Guanosine -5'monophosphate
GR (kinase)	: Growth- Associated (kinase)
GTP	: Guanosine -5'-triphosphate
HMG	: High Mobility Group
HTC	: Hepatoma cells
H1 Int	: H1 phosphorylée pendant l'interphase
H1 Met(Mit)	: H1 phosphorylée pendant la métaphase (pendant la mitose)
LMG	: Low Mobility Group
NAD	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NHP	: Non-histone protein
PCC	: Premature Chromosome Condensation
PDGF	: Platelet-derived Growth Factor
PMSF	: Phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride
RNA	: Acide ribonucléique
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
SDS	: Sodium dodecyl sulfate

AVANT-PROPOS

Les histones de la "core particle" jouent un rôle essentiel dans l'organisation du nucléosome : tandis que l'association des histones H3 et H4 en tétramère est suffisante pour conférer au DNA une structure semblable à celle du nucléosome, les histones H2A et H2B organisées en dimère interviendraient davantage pour stabiliser cette structure. Si H3 et H4 sont caractérisées par une structure très conservée au cours de l'évolution, H2A et H2B présentent une variabilité structurale plus ou moins marquée, accentuée dans certains cas par l'existence de variants. Nous avons déterminé la structure primaire des histones H2A et H2B isolées d'un organisme primitif, l'Etoile de mer *Asterias rubens*. Dans chacune de ces histones, nous avons défini des domaines de structure variable (régions basiques N- et C-terminales pour H2A, région basique N-terminale pour H2B) ainsi qu'un domaine hydrophobe de structure conservée, siège des interactions protéine-protéine, fondamentales dans l'organisation de la chromatine. La chromatine de gonade d'Etoile de mer renferme deux variants d'histone H2A présents en quantité équimoléculaire. Le rôle de ces variants d'histones n'est pas parfaitement élucidé mais leur présence implique une modification de conformation et d'interaction des protéines entre elles. Les mutations observées dans les histones H2A et H2B d'Etoile de mer conduisent en outre à la perte d'un site important de phosphorylation pour chaque histone.

Connaissant le rôle important que joue la phosphorylation dans les métabolismes cellulaires, nous avons par ailleurs déterminé les sites de phosphorylation des core histones libres ou associées en complexes, puis associées au DNA dans la "core particle" et dans la chromatine. Toutes ces expériences ont été réalisées en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique isolée du pancréas de Rat. La spécificité de cette kinase est comparée à celle d'une kinase non activée par l'AMP cyclique et associée à la croissance en utilisant comme substrat, l'histone H5, histone spécifique des érythrocytes nucléés.

CHAPITRE I

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

PLAN DU CHAPITRE I - INTRODUCTION

I - 1 CONSTITUTION DE LA CHROMATINE

I - 2 ORGANISATION DE LA CHROMATINE

I - 2-1 Nucléosome et "core particle"

I - 2-2 Forme et dimensions de la "core particle"

I - 2-3 Rôle structural des histones

I - 2-4 Superstructure de la chromatine

I - 2-5 Protéines non-histones

I - 2-6 Chromatine active

I - 1 CONSTITUTION DE LA CHROMATINE

Dans le noyau des cellules eucaryotes, les gènes sont associés à des protéines pour former un complexe appelé chromatine. Si nous considérons que, dans chaque cellule de notre organisme, il y a environ 1,70 m de DNA et que ce DNA est contenu dans un noyau de dix microns de diamètre, le taux de compaction du DNA est de l'ordre de $1,7 \times 10^5$. Cette extrême compaction est le fait de multiples interactions protéine-protéine et protéine-DNA.

S'il n'est pas toujours aisé de relier la structure et la fonction de la chromatine, nous savons maintenant que l'organisation et l'activité du génome sont modulées par deux groupes distincts de protéines chromosomales :

- les histones : protéines basiques qui interagissent avec le DNA par l'intermédiaire de liaisons ioniques et hydrophobes. Ces protéines sont directement responsables de la compaction du DNA dans le noyau de la cellule.

- les protéines non-histones : ces protéines constituent un groupe très complexe et relativement mal défini où se retrouvent des protéines de structure, des protéines contractiles, des récepteurs d'hormones, des enzymes requis pour les

fonctions essentielles du noyau ainsi qu'un certain nombre de protéines non caractérisées qui joueraient un rôle dans le contrôle de l'expression génétique.

Alors que le rapport histones/DNA est généralement voisin de 1, le rapport protéines non-histones/DNA varie de 0.5 à 1.5 en fonction de l'espèce considérée et de la nature du tissu. De plus, il semble qu'il y ait corrélation entre la quantité de non-histones et l'activité métabolique de la cellule. Par contre, chaque cellule d'un même organisme renferme la même quantité de DNA, quantité extraordinairement importante qui implique plusieurs niveaux de compaction.

I - 2 ORGANISATION DE LA CHROMATINE

I - 2-1 Nucléosome et "core particle"

La chromatine est organisée en une chaîne flexible de sous-unités appelées nucléosomes qui représentent le premier niveau de compaction du DNA (compaction d'un facteur 7 environ).

Le nucléosome a été mis en évidence indirectement en 1973 par HEWISH et BURGOYNE qui observèrent sur le DNA la présence de sites régulièrement espacés et sensibles à l'action d'une endonucléase. A la même époque, WOODCOCK (1973), OLINS et OLINS (1974) et OUDET et coll. (1974) observèrent en microscopie électronique des particules sphériques de 100 Å de diamètre, disposées linéairement et présentant l'aspect d'un collier de perles.

Le nucléosome ainsi observé contient un core protéique constitué de deux molécules de chacune des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4 et un fragment de DNA (Figure 1) (LASKEY et EARNSHAW, 1980) situé en position externe auquel sont associées une molécule d'histone H1 (ou H5) et des protéines non-histones. La longueur moyenne du DNA par nucléosome est d'environ 200 paires de bases chez les Mammifères, mais elle varie suivant l'organisme ou le tissu considéré : 154 paires de bases de DNA dans le nucléosome du champignon *Aspergillus nidulans* (MORRIS, 1976) et 241 paires de bases de DNA dans le nucléosome de sperme d'Oursin (COMPTON et coll., 1976).

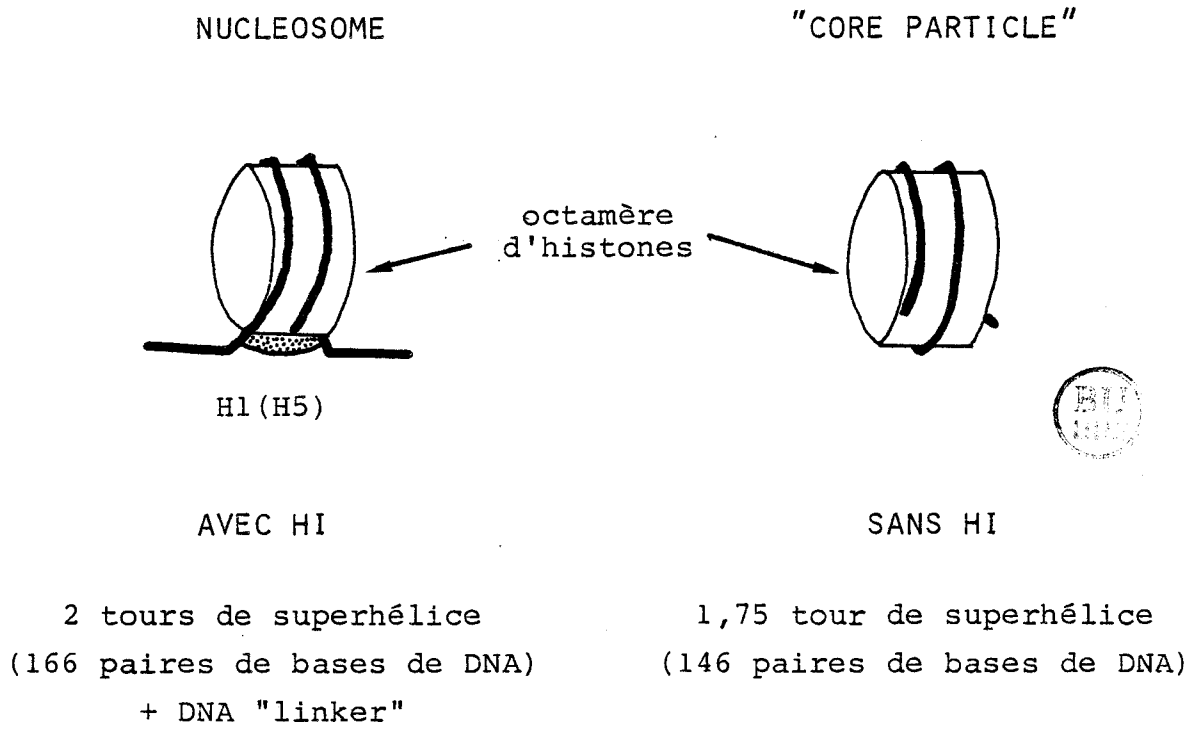


FIGURE 1 SCHEMA STRUCTURAL DU NUCLEOSOME ET DE LA "CORE PARTICLE"

Le DNA entoure un cylindre protéique plat constitué de deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4
 LASKEY et EARNSHAW (1980)

La sous-unité de la chromatine ainsi définie est hétérogène à la fois par la longueur du DNA qui la constitue et par la présence ou l'absence de l'histone H1 et de protéines non-histones.

En fait, une action prolongée de la nucléase de staphylocoque sur la chromatine (NOLL et KORNBERG, 1977) montre que la digestion se fait en deux étapes :

- première étape : obtention de particules contenant 166 paires de bases de DNA, l'octamère des quatre histones et une molécule de H1 - c'est le chromatosome (SIMPSON, 1978).

- deuxième étape : la longueur du DNA est réduite à 146 paires de bases enroulées en 1,75 tour autour de l'octamère des quatre histones - c'est la "core particle" (KORNBERG, 1974). Elle ne contient pas de H1. Ceci suggère que l'histone H1 interagit avec les fragments de DNA qui ont été hydrolysés entre les deux étapes (WANG, 1982). La "core particle" est une sous-unité constante quels que soient les tissus ou les organismes considérés.

Dans la chromatine, les "core particles" sont liées les unes aux autres par le DNA "linker" auquel sont associées une molécule d'histone H1 (ou H5) et des protéines non-histones de type HMG*.

* Les protéines non-histones (NHP) sont divisées en deux groupes suivant leur mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide :

- les HMG ou "high mobility group"
- les LMG ou "low mobility group"

I - 2-2 Forme et dimensions de la "core particle"

L'étude de la diffusion des neutrons par la "core particle" en solution (PARDON et coll., 1975) et l'étude de la diffraction des rayons X par la "core particle" cristallisée, associée aux résultats obtenus en microscopie électronique (FINCH et coll., 1977) convergent vers un modèle unique montrant qu'il n'y a pas de différence majeure dans la forme de la "core particle" qu'elle soit en solution ou cristallisée.

La "core particle" est représentée comme un disque de 11 nm de diamètre et de 5,5 nm d'épaisseur (Figure 2).

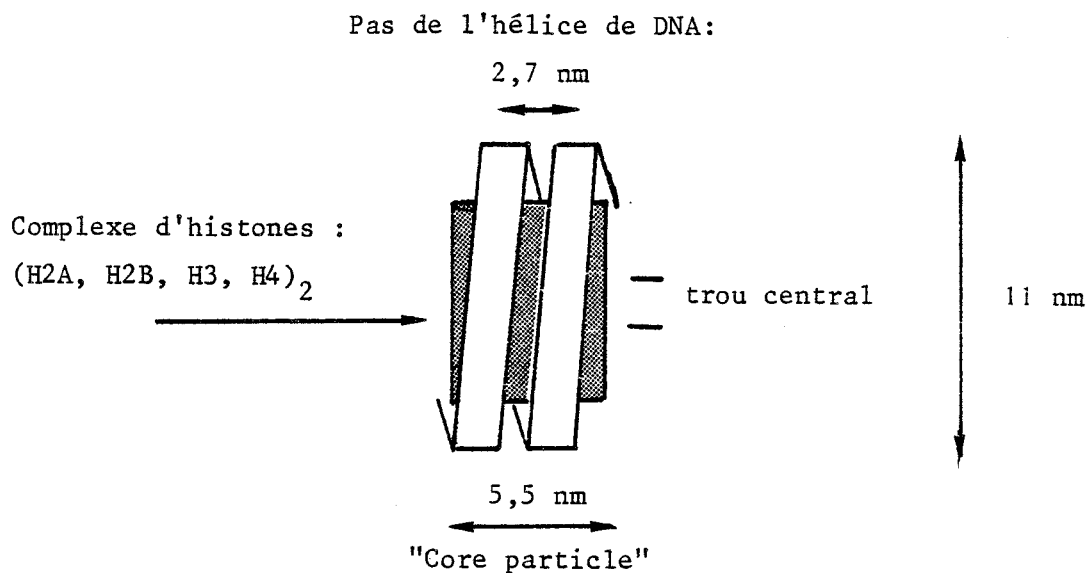


FIGURE 2 MODELE POUR LA STRUCTURE DE LA "CORE PARTICLE"
DEDUITE DES ETUDES DE DIFFUSION DES NEUTRONS.

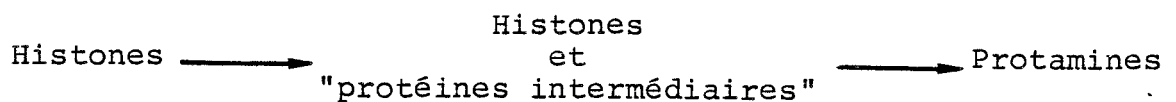
BRADDOCK, G.W., BALDWIN, J.P. et BRADBURY, E.M. (1982)

Le DNA est enroulé autour de l'octamère d'histones en 1,75 tour de superhélice dont le pas est de 2,7 nm.

I - 2-3 Rôle structural des histones

Les histones constituent un petit groupe de protéines basiques de masse moléculaire comprise entre 11.000 et 21.000 daltons. Dans la plupart des tissus somatiques des Eucaryotes, elles sont au nombre de cinq : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Les érythrocytes nucléés des oiseaux, poissons, reptiles et batraciens renferment une histone spécifique, l'histone H5 qui remplace progressivement et partiellement l'histone H1 au cours de la maturation de l'érythrocyte. L'histone H1 est en fait un ensemble de plusieurs sous-fractions qui présentent une étroite parenté structurale. Une histone particulière H1° (PANYIM et CHALKLEY, 1969) est présente dans les tissus à faible taux de prolifération ; ces deux dernières histones auraient un rôle déterminant dans la condensation de la chromatine et l'inhibition de la transcription (HARRIS et coll., 1982).

Les histones, protéines de structure, présentes dans le noyau de toute cellule somatique, sont progressivement remplacées au cours de la spermatogénèse, par des protéines plus petites et plus basiques : les protamines. Ce remplacement se fait en deux étapes :



Ces transitions dont le mécanisme et le rôle sont encore obscurs posent le problème de la régulation des gènes correspondants. Elles sont actuellement étudiées sous leurs aspects morphologiques, biologiques et biochimiques, chez un poisson (la Roussette) dans le laboratoire du Professeur CHEVAILLIER à Créteil et chez un mammifère (le Béliet) dans le laboratoire du Docteur LOIR à Rennes en collaboration étroite avec notre propre laboratoire.

I - 2-3-1 Caractéristiques structurales des histones

La répartition des acides aminés basiques apporte une totale asymétrie dans la répartition des charges positives dans la chaîne polypeptidique. Les quatre histones constituant la "core particle" (H2A, H2B, H3 et H4) possèdent une région N-terminale très basique (riche en lysine) qui représente environ le quart de la molécule. Cette région, de structure inorganisée, serait impliquée dans les interactions électrostatiques avec les groupes phosphate du DNA. Le reste de la chaîne protéique présente un caractère hydrophobe dû à l'abondance de résidus apolaires qui favorisent la formation d'hélice α dans cette partie de la molécule. Cette zone hydrophobe, particulièrement bien conservée au cours de l'évolution, permet les interactions protéine-protéine. Dans l'histone H2A, une courte séquence basique et variable termine la chaîne peptidique.

Dans l'histone H1, on peut déterminer trois domaines :

- le domaine aminé terminal basique (résidus 1 à 35)
- le domaine globulaire central hydrophobe (résidus 36 à 121)
- le domaine carboxy terminal très basique (résidus 122 à 212)

Les régions N- et C-terminales de cette histone sont très variables suivant l'espèce ou le tissu considéré.

Par contre, les histones H3 et H4 montrent une remarquable conservation de leur séquence en acides aminés à travers l'évolution des espèces. Une telle conservation suppose que chaque résidu de la chaîne protéique est impliqué dans des interactions qui sont essentielles pour que ces protéines puissent jouer leur rôle structural dans l'organisation du nucléosome.

Les histones H2A et H2B ont une structure plus variable suivant l'espèce et l'état de différenciation du tissu : c'est une des raisons pour laquelle nous nous sommes attachée à l'étude de ces protéines isolées d'organismes très primitifs tels que les Echinodermes.

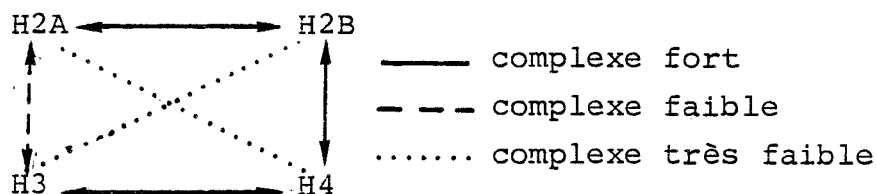
En outre, depuis la découverte de variants d'histones par FRANKLIN et ZWEIDLER en 1977, et la mise au point, pour leur séparation, d'un système électrophorétique utilisant des détergents non ioniques tel le Triton X-100, de nombreux variants des histones H1, H2A, H2B et à un degré moindre H3 ont été caractérisés dans les tissus animaux et végétaux (COHEN et coll., 1975 ; FRANKLIN et ZWEIDLER, 1977 ; BLANKSTEIN et coll., 1977).

Enfin, au cours de la spermatogénèse, les changements morphologiques de la cellule sont associés à de profonds remaniements biochimiques dans les protéines chromosomales qui se traduisent en particulier par la présence de nombreux variants d'histones différemment exprimés au cours des différents stades de la spermatogénèse; la question de savoir si ces variants sont équivalents physiologiquement ou s'ils ont un rôle particulier à jouer, reste posée. Toutefois, une réponse préliminaire à cette question a été apportée très récemment par les travaux de KOLODRUBETZ et coll.(1982) qui, ayant isolé deux variants de l'histone H2A et deux variants de l'histone H2B chez la levure ont montré que chaque variant de H2A pouvait s'associer, de manière non spécifique, avec l'un des deux variants de l'histone H2B. Quoi qu'il en soit, l'existence de sous-types d'histones est l'un des facteurs de l'hétérogénéité des nucléosomes dans la chromatine. La distribution des variants d'histones a pu être appréhendée par des méthodes immunologiques : en employant des anticorps spécifiques de chaque variant de l'histone H2A (H2A-1 et H2A-2), BENEZRA et ses collaborateurs (1981) ont observé des différences très importantes dans la fixation des anticorps anti-H2A-1 et anti-H2A-2 à la chromatine isolée de cellules de leucémie de Friend. Ceci indique une différence d'accessibilité de chaque variant. De plus, la réactivité d'un variant vis-à-vis de son anticorps spécifique au sein de la chromatine varie également en fonction du stade d'évolution de la cellule

leucémique. Ces travaux démontrent une hétérogénéité dans la distribution de chaque variant dans la chromatine et dans les sous-populations nucléosomales et suggèrent, pour chaque variant, un rôle spécifique dans la structure et l'activité d'un gène donné.

I - 2-3-2 Interactions histone-histone

Sans mesurer l'importance de leur observation, SKANDRANI et coll. (1972) ont été les premiers à mettre en évidence l'existence d'un complexe (H2A-H2B) par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Ces travaux furent confirmés par KELLEY un an plus tard en 1973. Puis les interactions entre molécules d'histones furent étudiées de façon plus générale par dichroïsme circulaire et diffusion de la lumière : D'ANNA et ISENBERG (1974) mirent ainsi en évidence l'existence de complexes histone-histone dont les différentes possibilités sont représentées dans le schéma suivant :



Ces différents types d'interaction entre les histones aboutissent à la formation de complexes qui s'accompagne d'une augmentation très nette du taux d'hélicité α^* .

* Cette propriété nous a permis, lors de nos études sur la phosphorylation des complexes d'histones, de contrôler par dichroïsme circulaire, que notre matériel était effectivement un complexe et non un mélange équimoléculaire des histones.

En solution à force ionique physiologique, les histones H2A et H2B interagissent pour former un dimère tandis que H3 et H4 forment un tétramère (KORNBERG et THOMAS, 1974 ; EICKBUSH et MOUDRIANAKIS, 1978). Une structure octamérique est seulement trouvée en solution de haute force ionique avec des concentrations élevées d'histones (THOMAS et KORNBERG, 1975 ; EICKBUSH et MOUDRIANAKIS, 1978 ; RUIZ-CARRILLO et JORCANO, 1979).

Dans le schéma d'EICKBUSH et MOUDRIANAKIS présenté figure 3, l'octamère d'histones est maintenu par deux types d'interactions :

- interactions fortes, stables, de nature hydrophobe formant, d'une part, le tétramère $(H3-H4)_2$ et d'autre part, le dimère H2A-H2B.
- interactions faibles associant le tétramère $(H3-H4)_2$ et deux dimères H2A-H2B en un octamère.

Les régions nécessaires aux interactions entre les différentes histones ont été déterminées par spectroscopie de RMN (MOSS et coll., 1976 ; BRADBURY et coll., 1978) : il s'agit pour le dimère H2A-H2B des régions 18 à 118 pour H2A et 32 à 114 pour H2B et pour le tétramère $(H3-H4)_2$, des régions 42 à 120 pour H3 et 38 à 102 pour H4.

Par ailleurs, des études de pontage par les rayons ultraviolets et par le tétranitrométhane ont permis d'obtenir un trimère H2A-H2B-H4 (MARTINSON et Mc CARTY, 1976), montrant

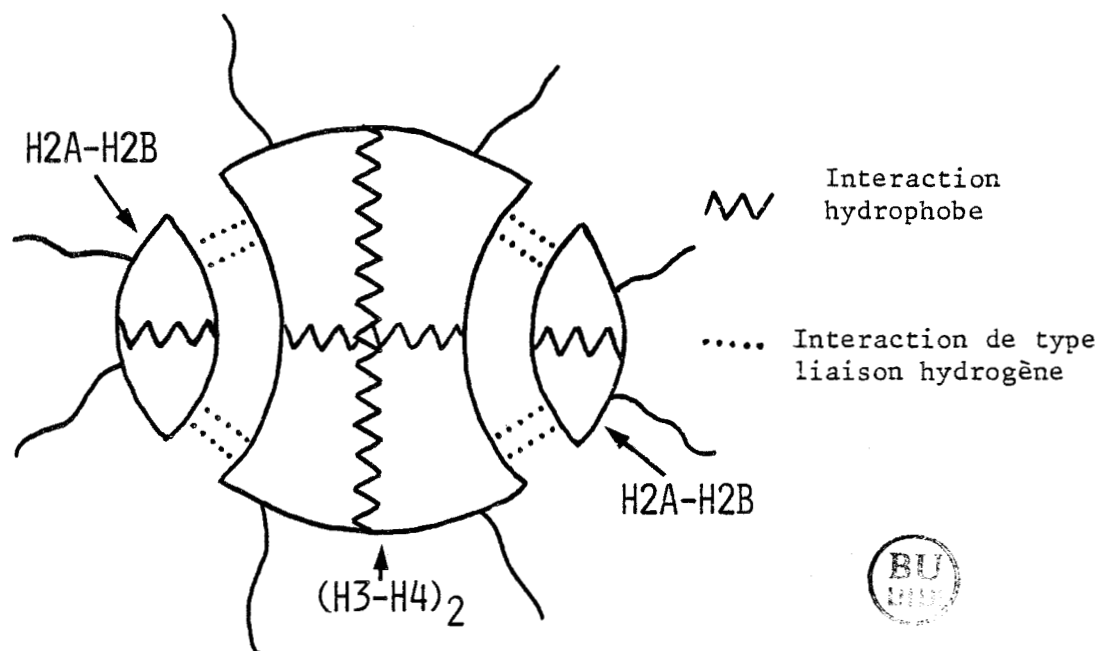


FIGURE 3 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE DANS LA "CORE PARTICLE"

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

qu'il existait sur l'histone H2B, deux sites distincts d'interaction, l'un avec H2A, situé dans le tiers médian de la molécule, l'autre avec H4, situé dans le tiers C-terminal (MARTINSON et coll., 1979).

Outre son interaction avec l'histone H2B, l'histone H2A, quant à elle, est impliquée, par sa partie C-terminale, dans une interaction avec la zone globulaire de l'histone H1 (région 74 à 106) (BOULIKAS et coll., 1980 ; ISHIMI et coll., 1981).

Ainsi, les zones d'interaction entre les histones sont des régions structurées, à caractère hydrophobe. Ces zones sont extraordinairement bien conservées au cours de l'évolution, comme le montre la possibilité de former des complexes hétérologues (LIBERATI-LANGENBUCH et coll., 1980). Par contre, les régions N-terminales, variables, n'interviennent pas dans ces interactions, puisque leur élimination par hydrolyse tryptique ménagée, n'empêche pas la formation de ces complexes (BÖHM et coll., 1977).

L'existence de fortes interactions entre les histones est fondamentale pour le maintien de la structure protéique compacte du nucléosome.

I - 2-3-3 Organisation des histones dans le nucléosome

Le tétramère (H3-H4)₂ joue un rôle important dans la structuration du DNA en lui imposant un tour de superhélice pour 80 paires de bases, formant ainsi, à lui seul, une

structure semblable au nucléosome (KLUG et coll., 1980); le rôle des dimères H2A-H2B serait alors de compléter et de stabiliser cette structure.

Les régions N-terminales des histones de la "core particle" (H2A, H2B, H3 et H4) sont très basiques et apparaissent comme le siège privilégié pour les liaisons électrostatiques avec les groupes phosphate du DNA. Toutefois, les études en résonance magnétique nucléaire réalisées par CARY et ses collaborateurs en 1979 montrent que ces régions peuvent ne pas être complètement liées au DNA de la "core particle" ; elles seraient même plutôt faiblement liées puisque après leur élimination par hydrolyse trypsique, la chromatine garde la plupart de ses caractéristiques initiales ; ainsi, la stabilité de la "core particle" est liée à l'existence de deux points d'interaction forte entre DNA et histones aux extrémités de la "core particle" (groupes phosphate situés aux positions 1 et 2 d'une part, 145 et 146 d'autre part) (ERARD et coll., 1981).

Les extrémités N-terminales basiques des histones ne semblent pas indispensables à la structure de la "core particle" (WHITLOCK et SIMPSON, 1977) ; elles interviendraient davantage à l'extérieur de la "core particle" soit en interagissant avec le DNA "linker", soit en participant à la formation ou au maintien d'une structure d'ordre supérieur comme ceci a déjà été démontré pour l'histone H1 (ALLAN et coll., 1982). Cette dernière histone possède dans sa séquence trois

domaines structuraux qui ont un rôle particulier dans la structure de la chromatine : la zone globulaire (résidus 36 à 121) "verrouille" les deux tours de superhélice de DNA (166 paires de bases) qui entourent l'octamère d'histones (ALLAN et coll., 1980) (Figure 4) tandis que les extrémités basiques N- et C-terminales se lient tout le long du DNA nucléosomal laissé libre par les histones de la "core particle" et participent au maintien de la condensation du DNA. Ainsi, l'histone H1 permet un rapprochement des nucléosomes et des études de pontage réalisées par THOMAS et KHABAZA en 1980 ont montré que des homopolymères de l'histone H1 se forment à faible force ionique, ce qui implique que les histones H1 soient proches l'une de l'autre (0.7 à 1.1 nm).

Une altération des interactions histone H1-histone H1 ou histone H1-DNA pourrait influencer le degré de condensation de la chromatine (ADLER et coll., 1972 ; BRADBURY et coll., 1973-a). L'existence de sous-fractions de l'histone H1 dont les quantités relatives varient avec le type cellulaire (PANYIM et CHALKLEY, 1969) conduit à une diversité structurale le long de la chaîne de nucléosomes (HOHMANN, 1978) ; à cette diversité structurale, s'ajoutent de nombreuses modifications de l'histone H1 (par phosphorylation et ADP-ribosylation) susceptibles d'altérer l'interaction de l'histone avec le DNA et d'influencer la stabilité de la superstructure de la chromatine à laquelle participent essentiellement l'histone H1 (ou l'histone H5) et les extrémités basiques N-terminales des histones de la "core particle", H2A, H2B, H3 et H4.

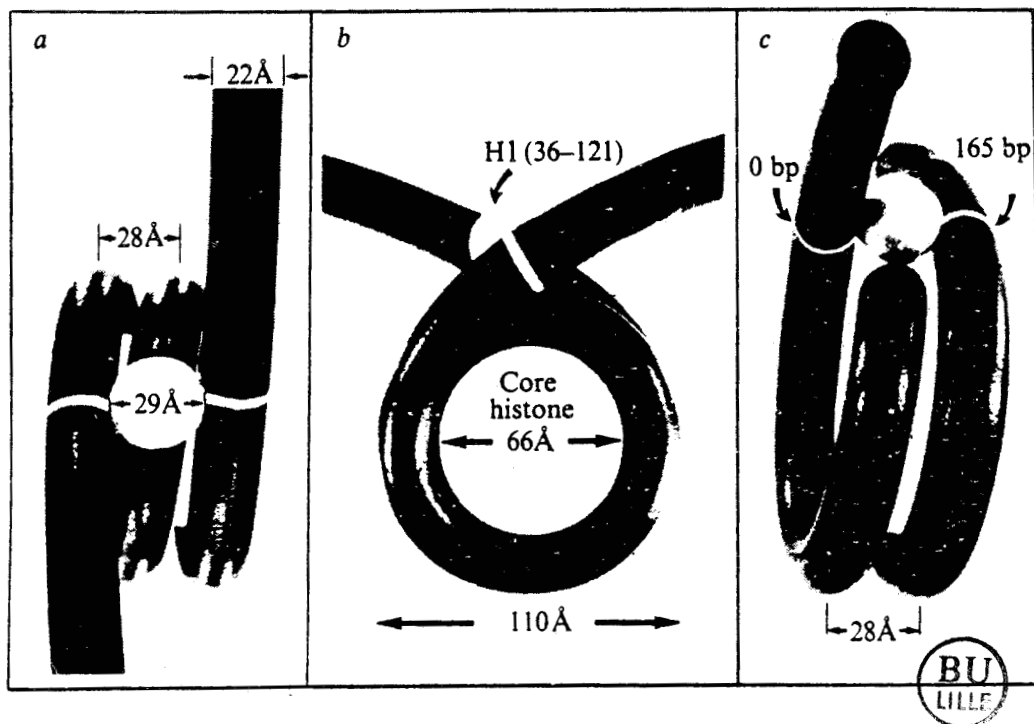


FIGURE 4 MODELE PROPOSE POUR LA LOCALISATION DU DOMAINE GLOBULAIRE DE L'HISTONE H1 (OU DE L'HISTONE H5) DANS LE CHROMATOSOME.

D'après J.ALLAN, P.G.HARTMAN, C.CRANE-ROBINSON et F.X.AVILES (1980).

bp : paire de bases de DNA.

I - 2-4 Superstructure de la chromatine

L'association des nucléosomes par l'intermédiaire du DNA "linker" conduit, à faible force ionique, à la formation d'une chaîne polynucléosomale ou nucléofilament de 10 nm de diamètre (FINCH et KLUG, 1976) où les nucléosomes sont disposés en zigzag; puis lorsqu'on augmente la concentration saline jusqu'à une force ionique physiologique, la chromatine prend une structure hélicoïdale (THOMA et coll., 1979) (Figure 5) et apparaît en microscopie électronique comme une fibre de 20 à 30 nm où le niveau de compaction du DNA est d'environ 40. A ce niveau, deux modèles de superstructure sont proposés :

- un modèle appelé solénoïde ou superhélice continue, mis en évidence par diffusion de neutrons (SUAU et coll., 1979). Le solénoïde comporte six nucléosomes par spire et un septième nucléosome au centre de la spire.

- un modèle où des structures globulaires sont disposées à intervalles réguliers le long d'une chaîne flexible. Ces structures globulaires appelées nucléomères ou encore "superbeads" contiendraient chacune 6 à 10 nucléosomes et seraient le résultat d'un repliement désordonné de la chaîne polynucléosomale (RENZ et coll., 1977; KIRYANOV et coll., 1982).

Quel que soit le type de superstructure considéré, tous les auteurs s'accordent à reconnaître le rôle fondamental de l'histone H1 (ou H5) (RENZ et coll., 1977; THOMA et coll., 1979; ALLAN et coll., 1981). En effet, la chromatine débarrassée de l'histone H1 a une structure relâchée et étendue qui s'organise

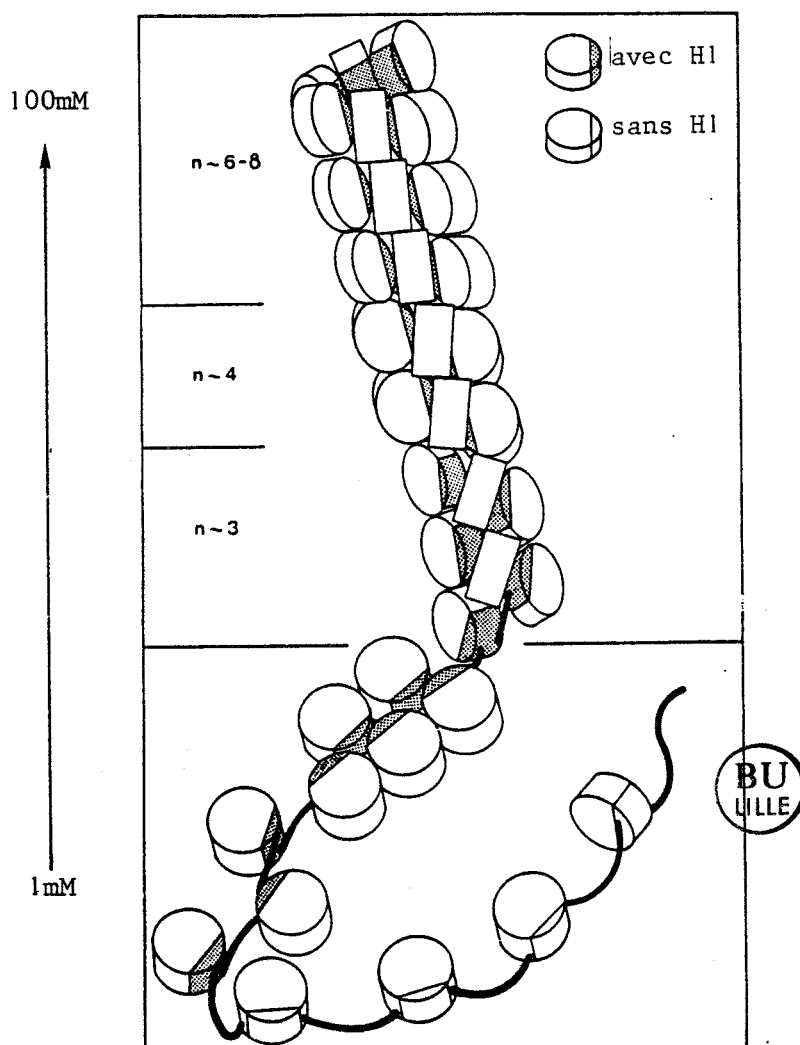


FIGURE 5 VARIATION DE LA STRUCTURE DE LA CHROMATINE EN FONCTION DE LA FORCE IONIQUE

selon THOMA et coll. (1979) J. Cell Biol., 83, 403-427.

en structure solénoïdale dès l'addition de cette histone. Tandis que la région centrale globulaire de l'histone H1 stabilise deux tours de superhélice de DNA autour de la "core particle", les extrémités basiques N- et C-terminales sont responsables de la condensation du DNA en favorisant le repliement du DNA "linker" et en participant à une interaction H1-H1. Cette histone serait placée alternativement à l'intérieur et à l'extérieur du solénoïde, stabilisant ainsi cette superstructure (Mc GHEE et coll., 1980). Toutefois, le mécanisme par lequel l'histone H1 interagit avec le DNA et maintient la chromatine dans un état condensé, n'est pas complètement élucidé. Récemment, les travaux de ALLAN et coll. (1982) ont montré que la structure en solénoïde est maintenue par l'histone H1 mais aussi par les extrémités N-terminales basiques des histones de la "core particle" ; en effet, ces régions basiques servent de lien entre des nucléosomes voisins et leur élimination par hydrolyse trypsique ménagée (BÖHM L. et coll., 1980 ; 1981 ; 1982) aboutit à une perte de la superstructure de la chromatine. Il faut noter toutefois le manque de spécificité de ces régions à générer la structure en solénoïde car un polypeptide basique de séquence analogue à celle du peptide C-terminal de l'histone H1 remplit le même rôle.

Le degré de structure en solénoïde ou en nucléomère est actuellement l'optimum auquel on puisse accéder dans le cadre d'études de chromatine en solution ; le niveau ultime de l'étonnante compaction du DNA dans les chromosomes (de l'ordre de 10^5) est apporté par certaines protéines non-histones qui en forment le squelette (PAULSON et LAEMLI, 1977).

I - 2-5 Protéines non-histones

Les protéines non-histones forment un groupe très hétérogène : tandis que certaines d'entre elles encore mal caractérisées, constituent le support protéique au niveau des chromosomes, d'autres mieux connues seraient au contraire responsables de la transition hétérochromatine \longrightarrow euchromatine : il s'agit de protéines HMG (High Mobility Group).

I - 2-5-1 Caractéristiques générales des protéines HMG

Les protéines de type HMG que l'on trouve à raison de 10^5 à 10^6 molécules dans le noyau de la cellule (JOHNS et coll., 1975) sont présentes dans 10 à 20 p.100 des nucléosomes.

Selon leur masse moléculaire, les protéines HMG sont séparées en deux groupes :

- HMG 1 et HMG 2 encore appelées HMG lourdes. Leur masse moléculaire est de 26.500 et 26.000, respectivement.

- HMG 14 et HMG 17 ou HMG "légères" dont la masse moléculaire est de 10.300 et 9.200 respectivement.

Ces protéines sont caractérisées, comme les histones, par l'existence de "domaines" dans leur structure primaire. Ainsi, la chaîne protéique des HMG 1 et 2 peut être représentée par trois domaines structuraux de longueur équivalente (REECK et coll., 1982) : les domaines N-terminal (résidus 1 à 92) et

central (résidus 98 à 176), de séquences homologues, sièges d'interactions avec le DNA et le domaine C-terminal (résidus 177 à 259), très acide (WALKER et coll., 1978) siège d'interactions électrostatiques avec les histones et en particulier avec certaines sous-fractions de l'histone H1 (SMERDON et ISENBERG, 1976).

I - 2-5-2 Interactions protéines HMG-DNA

Dans leur interaction avec le DNA, les protéines HMG ont une affinité toute particulière pour le DNA simple brin (ISACKSON et REECK, 1981 ; BONNE et coll., 1982) ; les HMG 1 et 2 sont des protéines capables de déstabiliser la double hélice (JAVAHERIAN et coll., 1979) ; elles affectent ainsi la conformation du DNA dans la chromatine qui, devenue moins compacte, est plus accessible pour la replication du DNA (SEYEDIN et KISTLER, 1979 ; BONNE et coll., 1982). Les travaux de SEYEDIN et KISTLER (1979), effectués sur onze organes différents prélevés chez le Rat, ont permis d'établir une corrélation frappante entre le taux de HMG 2 et l'activité de prolifération cellulaire ; par contre, l'histone H1° généralement associée aux tissus qui ne se divisent pas est trouvée en quantité inversement proportionnelle à celle de HMG 2. Dans ces conditions, on pourrait imaginer au niveau du DNA "linker", une alternance HMG 2 ↔ H1°, HMG 2 intervenant au moment de la replication et H1° étant présente en dehors de toute synthèse de DNA.

Des expériences similaires réalisées sur HMG 1 (BONNE et coll., 1982) ont permis d'associer cette protéine à la croissance cellulaire : ainsi dans le foie en régénération, la protéine HMG 1 qui déstabilise la double hélice, stimule la DNA polymérase alors qu'elle n'a aucune action dans les cellules du foie en phase stationnaire. Les protéines HMG 1 et 2 pourraient donc moduler l'activité de replication de la chromatine en fonction de l'état physiologique de la cellule.

La présence des protéines HMG est associée à une sensibilité accrue de la chromatine à l'action des nucléases : des expériences de reconstitution de nucléosome en présence des protéines HMG 14 et 17 ont montré que la coupure par la DNase I est inhibée aux sites 1,2,12 et 13 tandis qu'elle est intensifiée aux sites 4,5,9 et 10 (MARDIAN et coll., 1980); ceci est en faveur d'une liaison des protéines HMG 14 et 17 près de l'entrée et de la sortie du DNA de la "core particle" (Figure 6). En 1980 également, SANDEEN et coll. ont montré que chaque nucléosome pouvait lier de façon réversible, deux molécules de HMG 14/17 aux régions terminales du DNA où l'un des deux brins est libre d'histones.

L'association des protéines HMG avec les nucléosomes et leur présence dans les régions du génome activement transcrites peuvent constituer une indication quant au rôle que jouent ces protéines dans l'organisation de la chromatine et le contrôle de l'expression des gènes. Les mécanismes biochimiques qui permettent à ces protéines d'interagir de façon préférentielle

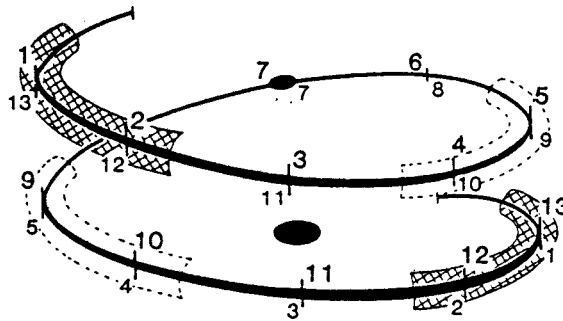


FIGURE 6 ALTERATION DES SITES DE COUPURE PAR LA DNase I SUR LA SUPERHELICE DE DNA EN PRESENCE DE LA PROTEINE HMG 14.

Les numéros de 1 à 13 correspondent aux sites de coupure par la DNase I, qui ont lieu toutes les 10,4 paires de bases. En présence de la protéine HMG 14, il n'y a pas de coupure aux sites 1, 2, 12 et 13 (aires hachurées) tandis que les coupures aux sites 4, 5, 9 et 10 sont intensifiées (zones en pointillé).

d'après MARDIAN, J.K.W., PATON, A.E., BUNICK, G.J. and OLINS, D.E. (1980) Science, 209, 1534-1536.

avec les gènes actifs sont inconnus mais des travaux très récents de REEVES et CHANG (1983) ont montré que ces protéines pouvaient être modifiées non seulement par méthylation, acétylation, phosphorylation, poly(ADP)ribosylation, mais aussi par glycosylation ; ainsi elles seraient associées à la matrice protéique nucléaire, elle-même impliquée dans la replication (BEREZNEY et BUCHHOLTZ, 1981 ; HUNT et VOGELSTEIN, 1981) et la transcription du DNA (JACKSON et coll., 1981 ; VAN EEKELEN et VAN VENROOIJ, 1981 ; ROBINSON et coll., 1982).

I - 2-6 La chromatine active

L'énorme degré de compaction de la chromatine dans le noyau rend le DNA difficilement accessible aux enzymes nécessaires à sa replication et à sa transcription : une modification de structure paraît nécessaire dans les régions de la chromatine qui seront activement transcrites (ce qui représente 10 à 20 p.100 des gènes). La preuve la plus évidente de ce changement de conformation est apportée par la sensibilité accrue de la chromatine active à la DNase I (WEINTRAUB et GROUDINE, 1976 ; GAREL et AXEL, 1976). Cette sensibilité semble être un phénomène général pour tous les gènes transcrits (GAREL et coll., 1977 ; GROUDINE et coll., 1978 ; STALDER et coll., 1978) en même temps qu'un phénomène très localisé qui ne concerne pas les régions adjacentes non transcrites (FLINT et WEINTRAUB, 1977).

Les nucléosomes qui contiennent des séquences activement transcrites deviennent résistants à la DNase I quand les protéines HMG sont extraites par une solution de NaCl 0.35M et retrouvent leur sensibilité dès l'addition des protéines HMG 14 et 17 (WEISBROD et coll., 1980). Par ailleurs, LEVY-WILSON et coll. (1979) ont montré que les régions de la chromatine renfermant des gènes actifs sont enrichies en HMG T (analogue à HMG 1 et 2), H6 (analogue à HMG 14 et 17) et en ubiquitine (HMG 20). Des travaux plus récents ont montré que ces régions étaient également enrichies en protéine A 24 (histone H2A liée à l'ubiquitine (LEVINGER et VARSHAVSKY, 1982)). Parallèlement, ces auteurs ont observé une diminution ou une perte de l'histone H1 qui serait alors remplacée par les protéines HMG 14 et 17 ou/et par les protéines HMG 1 et 2. (LEVY et DIXON, 1978 ; BAKAYEV et coll., 1978 ; JACKSON et coll., 1979 ; LEVY-WILSON et coll., 1979). Toutefois, le remplacement de l'histone H1 par les protéines HMG 14 et 17 dans les nucléosomes présents dans la chromatine active est controversée par les travaux de RING et COLE (1979) qui ont mis en évidence, par pontage, un complexe HMG 14(17)-H1 et par l'observation de SANDEEN et coll. (1980) selon laquelle les nucléosomes d'érythrocyte de Poulet contenant l'histone H1 ou l'histone H5 sont encore capables de fixer les HMG 14 et 17.

Bien que l'histone H1 soit généralement associée à une structure condensée et inactive, son absence dans la chromatine active, soulignée plus haut, pourrait s'expliquer par l'extrême sensibilité de cette histone à la protéolyse et par sa dissociation facile de la chromatine à faible force ionique.

La présence des protéines HMG dans les gènes actifs a été suggérée dès 1975 par JOHNS et coll. qui avaient remarqué une stimulation de la transcription par ces protéines. Depuis, de nombreux travaux ont confirmé cette hypothèse (VIDALI et coll., 1977 ; GEORGIEVA et coll., 1981) : les protéines HMG sont libérées en même temps que les gènes activement transcrits par digestion douce à la micrococcale nucléase ou à la DNase I (MAREKOV et BELTCHEV, 1982).

La sensibilité de la chromatine active à la DNase I est généralement associée à une hyperacétylation des histones qui, en diminuant leur interaction avec le DNA, rend la chromatine plus accessible aux nucléases ; les fragments de chromatine enrichis en séquences transcrites contiennent des histones hyperacétylées et de très nombreux travaux parmi lesquels il faut citer GOTTFELD et BUTLER, 1977 ; CANDIDO et coll., 1978 ; SEALY et CHALKLEY, 1978-a, ont permis d'établir la relation entre l'activité de la chromatine et l'acétylation des histones. D'ailleurs, les protéines HMG 14 et 17 également associées à la chromatine active participent à l'hyperacétylation des histones en inhibant partiellement les déacétylases (REEVES et CANDIDO, 1980). En travaillant sur des cellules de *Physarum polycephalum* naturellement synchrones, CHAHAL et coll. (1980) ont décrit une relation très nette entre la présence d'histone H4 tétraacétylée et l'activité de transcription alors que durant la mitose, l'acétylation de cette histone est minimale et inversement proportionnelle à la phosphorylation de l'histone H1.

Très récemment cependant, ces travaux ont été remis en cause : tandis que selon CHAHAL, l'acétylation de l'histone H4 et la synthèse du RNA chez *Physarum* sont deux processus biphasiques (en phase S et en fin de phase G2), pour LOIDL et ses collaborateurs (1983), l'acétylation de H4 présente un seul maximum en phase S. De plus, le fait que le butyrate entraîne une augmentation importante d'histone H4 diacétylée (H4 Ac₂) en même temps qu'une inhibition de la synthèse de RNA, n'est pas en faveur d'une relation acétylation-transcription *in vivo* (LOIDL et coll., 1983).

Quoi qu'il en soit, l'acétylation, qui est une modification locale et transitoire, n'est certainement pas suffisante pour promouvoir ou intensifier la transcription. Ainsi l'existence de variants d'histones, spécifiques de l'espèce et du tissu peut être le reflet de l'activation ou du blocage de gènes à différents stades d'organisation de l'être vivant et bien que le rôle de ces variants ne soit pas clair, des changements spécifiques dans les sous-types d'histones au cours du développement cellulaire suggèrent qu'ils ont un rôle important dans la différenciation (COHEN et coll., 1975 ; NEWROCK et coll., 1978). Un exemple frappant nous est donné par la présence de variants d'histones uniquement dans les macro-noyaux transcriptionnellement actifs de *Tetrahymena thermophila*. Chez ce protozoaire cilié qui contient deux types de noyaux (un macro-noyau et un micro-noyau), les variants sont absents du micro-noyau transcriptionnellement inerte (ALLIS et coll., 1980).

BAER et RHODES (1983) ont montré récemment que 15 p.100 des nucléosomes pouvaient fixer la RNA polymérase II ; cet enzyme, responsable de la transcription, se fixe de façon sélective sur les nucléosomes localisés sur les gènes transcrits, cette propriété étant liée au nucléosome lui-même et non pas à la séquence du DNA. Après détermination de la composition de ces nucléosomes par électrophorèse et densitométrie, il apparaît que les nucléosomes sur lesquels la RNA-polymérase vient se fixer, sont déficients en histones H2A et H2B et ne renfermeraient qu'un seul dimère H2A-H2B ; l'absence d'un dimère H2A-H2B dans ces nucléosomes pourrait être une caractéristique reliée à la transcription des gènes.

Chez les Eucaryotes, l'expression des gènes peut être régulée par de nombreux facteurs conduisant à une modification de structure ou décondensation de la chromatine : la sensibilité aux nucléases, la présence de protéines HMG, l'hyperacétylation des histones, la présence de variants, la fixation de la RNA polymérase sur certains nucléosomes sont autant de facteurs qui interviennent de façon coordonnée dans l'activation des gènes. Mais la cause des changements structuraux de la chromatine ne peut pas être impliquée uniquement aux protéines. En particulier la modification du DNA ou plus précisément la déméthylation de la 5-méthylcytosine est associée à une augmentation de la transcription (WEINTRAUB et coll., 1981). Parallèlement, BEHE et FELSENFELD (1981) ont montré que le passage de la chromatine décondensée à l'état

condensé pouvait être associé à la formation de DNA Z. Par déméthylation sélective, le DNA Z se déstabilise et entraîne un déroulement de la double hélice qui délimite une région hypersensible à la nucléase.

Enfin, la reconnaissance par les nucléosomes de séquences spécifiques du DNA ("phasing") (LOUIS et coll., 1980) et leur glissement le long du DNA ("sliding") permettant de masquer ou non les séquences régulatrices (HELENE, 1981) sont deux moyens possibles pour la transition chromatine inactive \longrightarrow chromatine active.

CHAPITRE II

MODIFICATIONS POST-SYNTHETIQUES DES PROTEINES DE LA CHROMATINE

PLAN DU CHAPITRE II

MODIFICATIONS POST-SYNTHETIQUES DES PROTEINES DE LA CHROMATINE

II - 1 ACETYLATION

- II - 1-1 L'acétylation: modification enzymatique des protéines
- II - 1-2 Localisation des sites d'acétylation
- II - 1-3 Effets du butyrate sur l'acétylation
- II - 1-4 Effets de l'acétylation sur la structure de la chromatine
- II - 1-5 Acétylation et transcription
- II - 1-6 L'acétylation au cours du cycle cellulaire

II - 2 PHOSPHORYLATION : VOIE MAJEURE DU CONTROLE DES ACTIVITES CELLULAIRES

- II - 2-1 Protéines kinases: diversité et spécificité
- II - 2-2 La phosphorylation au cours du cycle cellulaire
- II - 2-3 Importance de la phosphorylation dans la structure de la chromatine
- II - 2-4 Relation phosphorylation-acétylation
- II - 2-5 Phosphorylation de la tyrosine : nouveau type de modification des protéines

II - 3 METHYLATIONII - 4 ADP-RIBOSYLATION

- II - 4-1 Généralités
- II - 4-2 Protéines ADP-ribosylées
- II - 4-3 Importance de l'ADP-ribosylation dans la structure de la chromatine

II - 5 UBIQUITINATION

20 acides aminés seulement sont utilisés par la cellule lors de la synthèse protéique et pourtant quelque 140 acides aminés et dérivés ont été identifiés dans différentes protéines d'origine variées (UY et WOLD, 1977) : ces chiffres traduisent l'importance des modifications que subissent les protéines après leur synthèse. Tandis qu'une protéine peut subir simultanément plusieurs types de modifications, toutes les molécules d'une famille protéique ne sont pas modifiées de la même façon en même temps. L'hétérogénéité qui en découle est encore accrue par le "turn-over" quelquefois très rapide de réactions enzymatiques "en cascade".

Dans ce chapitre, nous allons faire le point des connaissances actuelles sur les modifications post-synthétiques des histones et des protéines HMG : l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ADP-ribosylation et "l'ubiquitination".

II - 1 ACETYLATION

La présence de groupements acétyl dans les histones fut découverte par PHILLIPPS en 1963 qui mit en évidence l'acétyl-sérine en position N-terminale dans les histones H1, H2A et H4. Cette modification apparemment contemporaine de la synthèse de la chaîne polypeptidique est irréversible. Un an plus tard, ALLFREY et ses collaborateurs (1964) décrivaient un autre type d'acétylation qui, par opposition au précédent, a lieu après la synthèse, est réversible et modifie des résidus de lysine intra-chaîne dans les histones H2A, H2B, H3 et H4 ainsi que dans les protéines HMG ; l'histone H1, pourtant très riche en lysine, ne possède pas d'acétyl-lysine.

II - 1-1 L'acétylation: modification enzymatique des protéines

Le transfert du groupe acétyl de l'acétyl-Coenzyme A sur la fonction ϵ -NH₂ de la lysine est catalysé par des acétyltransférases. Cette activité enzymatique a été isolée pour la première fois, du foie de Pigeon (NEHARA et coll., 1966). Depuis, des acétyltransférases ont été caractérisées dans différents tissus : foie de Veau (LIBBY, 1978), thymus de Veau

(SURES et GALLWITZ, 1980), lymphocytes de Boeuf (BÖHM J. et coll., 1980), hépatome de Rat (GARCEA et ALBERTS, 1980). Dans le thymus de Veau, trois acétyltransférases qui diffèrent par leur spécificité de substrat ou par leur localisation dans la cellule, ont été isolées :

- l'acétyltransférase A, étroitement liée à la chromatine, acétyle *in vitro* toutes les histones.

- l'acétyltransférase B, non active sur les mononucléosomes, serait présente essentiellement dans le cytoplasme et pourrait acétyler les histones dès leur synthèse, avant leur assemblage en nucléosomes ; cette acétyltransférase acétyle préférentiellement l'histone H4 et à un degré moindre l'histone H2A.

- l'acétyltransférase C : cet enzyme a la même spécificité de substrat que l'acétyltransférase A et pourrait être une forme agrégée de A.

Dans les lymphocytes de Boeuf, une acétyltransférase DB ("DNA-binding"), étroitement liée aux nucléosomes, a pour substrat préférentiel les histones H3 et H4 (BÖHM J. et coll., 1980).

L'acétylation des résidus de lysine est une modification réversible à "turn-over" extrêmement rapide (durée de la demi-vie : 10 minutes; JACKSON et coll., 1975). Le degré d'acétylation des protéines est lié à l'équilibre local entre l'activité des acétyltransférases et des déacétylases. Il est important de noter que toutes les molécules ne sont pas modifiées de

la même façon au même moment : ainsi des préparations purifiées d'histone H3 ou H4 sont effectivement hétérogènes, certaines molécules n'étant pas acétylées tandis que d'autres renferment 1, 2, 3 ou 4 résidus de ϵ -N-acétyllysine ; cette hétérogénéité qui se traduit par une différence de charge des molécules est facilement mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu acide-urée (PANYIM et CHALKLEY, 1969).

II - 1-2 Localisation des sites d'acétylation

La connaissance de la structure primaire a permis de déterminer les sites d'acétylation dans les histones isolées de différentes espèces (Truite : DIXON et coll., 1975 ; Veau : DOENECKE et GALLWITZ, 1982 ; Pois : DE LANGE et coll., 1969) ainsi que dans les protéines HMG (Veau: STERNER et coll.1979) (Tableau I). Les sites d'acétylation sont localisés dans la région N-terminale basique des protéines, siège privilégié des interactions avec les groupes phosphate du DNA ; en neutralisant la charge positive de la lysine, l'acétylation diminue les interactions électrostatiques entre protéine et DNA.

L'environnement des sites d'acétylation a conduit DIXON et coll. (1975) à individualiser deux types d'acétylation :

- Type A : la lysine acétylée est placée entre deux acides aminés à courte chaîne (glycine, alanine, sérine, thréonine).

TABLEAU I

SITES D'ACÉTYLATION DANS LES HISTONES* ET LES PROTEINES HMG** DE THYMUS DE VEAU

	Type A	Type B
H2A	Gly - ⁵ Lys(Ac) - Gln	
	Gly - ⁹ Lys(Ac) - Ala	
H2B	Thr - ²⁰ Lys(Ac) - Ala	Lys - ¹² Lys(Ac) - Gly
		Ser - ¹⁵ Lys(Ac) - Lys
		Lys - ²⁴ Lys(Ac) - Asp
H3	Gly - ¹⁴ Lys(Ac) - Ala	Arg - ⁹ Lys(Ac) - Ser
	Thr - ²³ Lys(Ac) - Ala	Arg - ¹⁸ Lys(Ac) - Gln
H4	Gly - ⁵ Lys(Ac) - Gly	Ala - ¹⁶ Lys(Ac) - Arg
	Gly - ⁸ Lys(Ac) - Gly	
	Gly - ¹² Lys(Ac) - Gly	
HMG 1	Gly - ² Lys(Ac) - Gly	
HMG 2	Gly - ¹¹ Lys(Ac) - Met	
HMG 14		Pro - ² Lys(Ac) - Arg
		Arg - ⁴ Lys(Ac) - Val
HMG 17	Ala - ¹⁰ Lys(Ac) - Gly	Pro - ² Lys(Ac) - Arg
		Arg - ⁴ Lys(Ac) - Ala

* Revue sur l'acétylation des histones : DOENECKE et GALLWITZ (1982) Molec. and Cellul. Biochem., 44, 113-128.

** Revue sur les modifications post-synthétiques des HMG : ALLFREY (1982) The HMG Chromosomal proteins, édité par JOHNS, E.W., Presse Académique pp 123-148.

- Type B : la lysine acétylée est adjacente à un résidu basique (lysine ou arginine).

Cette classification proposée par DIXON et coll. laisse supposer qu'un très court fragment de la chaîne polypeptidique est nécessaire pour la reconnaissance par l'enzyme et reflète l'existence de plusieurs enzymes de spécificité différente ; il est d'ailleurs frappant de constater que, dans la protéine HMG 1 par exemple, les résidus de lysine en position 6 et 7 qui représentent deux sites potentiels d'acétylation dans la région N-terminale de la protéine n'incorporent pas l'³H-acétate: ceci pourrait être lié à la spécificité de l'acétyltransférase ou à l'inaccessibilité des résidus de lysine.

II - 1-3 Effets du butyrate sur l'acétylation

Les cellules cultivées en présence de butyrate de sodium (à une concentration de 5 mM) présentent une augmentation progressive du degré d'acétylation des histones (RIGGS et coll., 1977) et des protéines HMG (STERNER et coll., 1979). Cette augmentation est réversible et résulte de l'effet inhibiteur du butyrate sur les déacétylases (SEALY et CHALKLEY, 1978-b). Toutefois, même en présence de concentrations élevées de butyrate de sodium (100 mM), 18 p.100 des molécules de H4 ne sont pas acétylées, ce qui implique que dans la cellule, un sixième des nucléosomes contient des molécules de H4 inaccessibles aux acétyltransférases (COUSENS et coll., 1979).

L'hétérogénéité au sein de la chromatine est également observée lors d'études cinétiques de l'hyperacétylation des histones de la "core particle" : après traitement de cellules d'hépatomes (HTC) par le butyrate 50 mM, 15 p.100 de chaque histone (H2A,H2B,H3 et H4) subissent une hyperacétylation (demi-vie : 7 minutes) puis une déacétylation rapide (demi-vie : 3 à 7 minutes) tandis que le reste des histones (85 p.100) est acétylé et déacétylé beaucoup plus lentement (200 minutes et 30 minutes réciproquement) (COVAULT et CHALKLEY, 1980). L'existence de deux populations distinctes d'histones en regard des cinétiques d'acétylation et de déacétylation a été confirmée récemment par les travaux de DUNCAN et coll.(1983). Il est intéressant de noter que la population d'histones rapidement acétylées (15 p.100) pourrait correspondre à la quantité de DNA effectivement transcrite dans les cellules de mammifères, le processus d'acétylation-déacétylation des protéines étant un mécanisme souple qui, par une perturbation locale de la structure de la chromatine, module la transcription des gènes. Toutes ces études sont généralement réalisées en présence de butyrate de sodium bien connu pour son effet inhibiteur sur les déacétylases. Cependant, en 1982, COVAULT et ses collaborateurs ont montré que l'exposition prolongée (20 heures) de cellules HTC à une solution 6 mM de butyrate conduit à une diminution non négligeable des acétyltransférases qui se traduit par une diminution du degré d'acétylation des protéines. Si l'effet du butyrate sur les déacétylases est immédiatement

réversible dès son élimination, son effet sur les acétyltransférases est plus lentement dissipé (24 heures). Ainsi selon les conditions utilisées, le butyrate peut induire une hyper- ou une hypoacétylation des protéines de la chromatine.

II - 1-4 Effets de l'acétylation sur la structure de la chromatine

L'accumulation de formes multiacétylées des protéines chromosomales a d'importantes conséquences sur la conformation du DNA : les noyaux de cellules traitées au butyrate présentent une sensibilité accrue à la DNase I (VIDALI et coll., 1978 ; SIMPSON, 1978 ; MATHIS et coll., 1978). Cet enzyme, qui, dès le début de la digestion, attaque le DNA entourant la "core particle" est sensible au degré d'acétylation des histones constituant le core protéique. De plus, il semble que le DNA "linker" adjacent aux histones modifiées soit également digéré préférentiellement par la DNase I (NELSON et coll., 1979), ceci facilitant une dégradation plus importante des nucléosomes dans ces régions.

Les sites d'action de la DNase I sont effectivement plus nombreux dans la chromatine hyperacétylée et l'un des sites les plus résistants à l'action de cet enzyme (60 nucléotides à partir de l'extrémité 5' terminale) dans la chromatine témoin devient sensible à l'action de l'enzyme lorsque les "core particles" contiennent des histones acétylées.

L'hyperacétylation des histones n'affecte pas seulement leurs interactions avec le DNA mais aussi leur conformation dans l'octamère: en utilisant un colorant spécifique du groupe-ment thiol, BODE et coll.(1980) ont étudié les variations de l'accessibilité de la cystéine 110 de l'histone H3 dans des nucléosomes isolés de cellules de Hamster chinois (CHO) traitées au butyrate et dans des cellules témoins. Leurs résultats montrent un renforcement des interactions histone-histone au détriment des interactions histone-DNA.

L'importance de l'acétylation dans la structure de la chromatine a également été mise en évidence très récemment en comparant le comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide des "core particles" différemment acétylées ; il ressort de ces études que les "core particles" contenant en moyenne plus de dix résidus de ϵ -N-acétyllysine ont une mobilité fortement réduite par rapport aux populations moins acétylées de "core particles". Cette diminution de mobilité serait due en partie à une augmentation de la force de friction, elle-même liée à une conformation ouverte de la "core particle" (BODE et coll.,1983).

Les changements dans la structure de la chromatine acétylée peuvent être également détectés par des méthodes immunochimiques qui montrent une diminution de la fixation des anticorps spécifiques des histones H2A et H3 à la "core particle" reconstituée avec l'histone H4 di- ou triacétylée (MULLER et coll.,1982).

Ces changements dans l'organisation du nucléosome hyperacétylé conduisent à une augmentation de sa solubilité en présence de chlorure de magnésium (PERRY et CHALKLEY,1982). Il

est probable que ces changements même subtils dans l'organisation du nucléosome puissent jouer un rôle essentiel en laissant passer la RNA polymérase à travers la structure nucléosomale (SEALY et CHALKLEY, 1978-a).

II - 1-5 Acétylation et transcription

Nombreux sont les travaux mettant en évidence une relation entre l'acétylation et la transcription de la chromatine. Pour ces études, les auteurs ont utilisé soit la chromatine active en mettant à profit ses propriétés particulières (solubilité, sensibilité à la DNase I), soit la chromatine inactive localisée, par exemple, dans le micro-noyau d'un protozoaire ou dans les erythrocytes d'oiseaux ou encore une fraction de DNA enrichie en DNA satellite non transcrit. Nous allons voir successivement les résultats auxquels ces différents travaux ont conduit.

Le fractionnement de la chromatine en fonction de sa solubilité en présence de cations mono- (Na^+) ou divalents (Mg^{++}) a permis de montrer un enrichissement en histones H3 et H4 hyperacétylées dans les régions transcrites de la chromatine. Le taux (30 à 40 p.100) d'histones H3 et H4 monoacétylées étant beaucoup plus important que la quantité d'histones impliquée dans les gènes actifs, il semble actuellement que seule une hyperacétylation (H3 et H4 tri- et tétraacétylées) peut apporter les changements structuraux requis pour

la transcription ; le reste de la chromatine génétiquement inactive contiendrait les formes les moins acétylées : en utilisant des lignées cellulaires dérivant de trois espèces de Souris qui diffèrent dans leur contenu en hétérochromatine, HALLECK et GURLEY (1981) ont remarqué que la quantité d'histones non acétylées (10 à 30 p.100) était proportionnelle à la quantité d'hétérochromatine.

Un autre exemple permettant de relier acétylation et activité de la chromatine nous est donné par l'étude des modifications post-synthétiques des histones chez *Tetrahymena* ; en effet, ce protozoaire cilié comprend un macro-noyau transcriptionnellement actif et un micro-noyau inactif. Dans ce dernier, les histones ne sont pas ou peu modifiées, non pas en raison d'une activité accrue des déacétylases mais vraisemblablement par absence d'acétylation ; par contre, dans le macro-noyau actif, les histones de la "core particle" sont acétylées à des degrés divers (VAVRA et coll.,1982).

D'autres cellules génétiquement inactives telles que les érythrocytes de Poulet (WOUTERS-TYROU et coll.,1981), d'Oiseaux (BROTHERTON et coll.,1981) ou les cellules spermatiques de certains invertébrés (WANG et coll., 1972) ne contiennent pas d'histones hyperacétylées. Toutefois, au cours des premiers stades de la spermatogénèse ou dans le tissu testiculaire de Seiche synthétiquement actif, l'histone H4 est hyperacétylée (WOUTERS-TYROU et coll.,1981).

Enfin, dans une préparation enrichie en DNA satellite (représentant 65 p.100 du DNA total), PASHEV et coll. (1983) n'ont pas trouvé (ou très peu) d'histones hyperacétylées associées à ce DNA non transcrit.

Tous les travaux auxquels nous venons de faire référence s'accordent pour associer l'hyperacétylation des histones à l'activation de la chromatine.

Toutefois, en suivant le taux d'acétylation de l'histone H4 au cours des différents stades de la spermatogénèse chez la Truite, CHRISTENSEN et DIXON (1982) n'ont pas trouvé d'hyperacétylation au niveau des spermatogonies et spermatocytes transcriptionnellement actifs alors que le degré d'acétylation augmente brusquement durant la spermiogénèse, c'est-à-dire au cours de la transition spermatides \longrightarrow sperme mature, caractérisée par une diminution d'activité de la chromatine. Ce cas inhabituel d'hyperacétylation dans la chromatine inactive pourrait être relié au remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogénèse.

Simultanément, OLIVA et MEZQUITA (1982), en effectuant des travaux similaires à ceux de CHRISTENSEN et DIXON, ont observé chez le Coq, une acétylation intense de l'histone H4 tout au long de la spermatogénèse, avec un maximum d'acétylation dans les spermatides allongées transcriptionnellement inactives. A ce stade de la spermatogénèse, durant la transition histones \longrightarrow protamines, l'hyperacétylation de l'histone H4 pourrait

être impliquée dans les profonds changements structuraux de la chromatine, changements qui exposent des sites de liaison au DNA pour des protéines chromosomales telles que les enzymes impliquées dans la transcription.

II - 1-6 L'acétylation au cours du cycle cellulaire

Les interactions DNA-protéines chromosomales subissent un certain nombre d'altérations au cours du cycle cellulaire, de la synthèse coordonnée des histones et du DNA en phase S, à la compaction des chromosomes à la mitose (Figure 7). L'acétylation des histones est l'un des moyens utilisés par la cellule pour moduler ces interactions.

Les histones H3 et H4 sont acétylées dès leur synthèse dans le cytoplasme, puis sont déacétylées dès leur entrée dans le noyau et rapidement réacétylées dans le cycle cellulaire où elles ont été synthétisées (SHEPHERD, 1973 ; RUIZ-CARRILLO et coll., 1975).

Dans les cultures cellulaires, le butyrate conduit à un enrichissement en cellules en phase G1 et même à un arrêt du cycle en cette phase lorsqu'il est introduit à une concentration suffisante. L'emploi de cet acide gras à courte chaîne n'était donc pas recommandé pour suivre l'évolution de l'acétylation des protéines au cours du cycle cellulaire. Par contre, les cellules naturellement synchrones de la moisissure *Physarum polycephalum* ont constitué un matériel de choix pour cette étude.

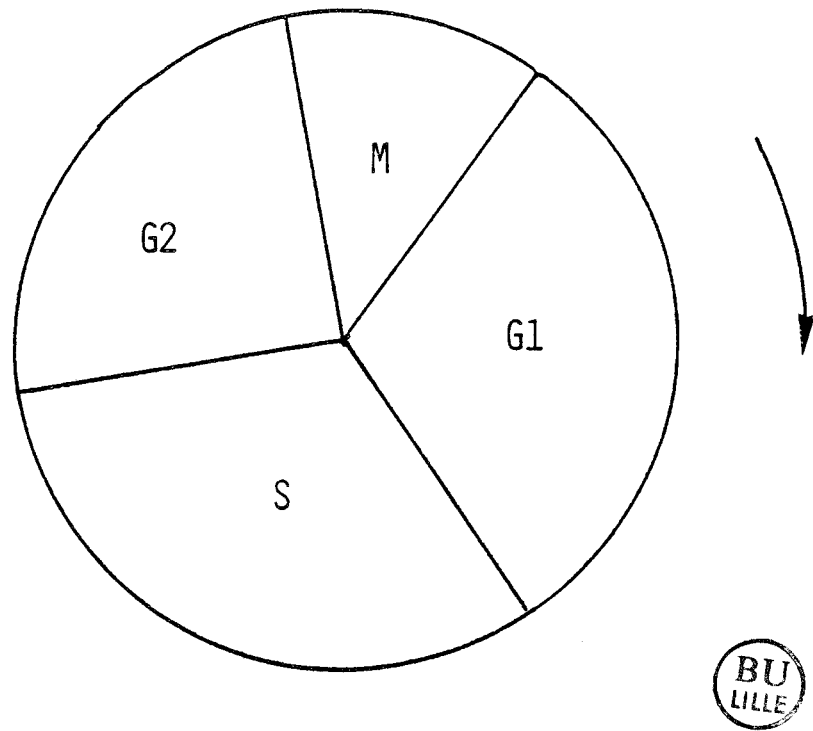


FIGURE 7 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire est une alternance entre la mitose et l'interphase (phases G1, S et G2). La durée de chaque phase varie avec la nature de la cellule considérée.

Des travaux de WATERBORG et MATTHEWS (1983), il ressort que :

- durant la mitose, période où la chromatine est très condensée, les histones ne sont pas acétylées.
- durant la phase S, période de transcription et de replication du DNA, les quatre histones de la "core particle" sont acétylées à des degrés divers.
- enfin durant la phase G2, période où se poursuit uniquement la transcription, les histones H3 et H4 atteignent leur degré maximum d'acétylation tandis que les histones H2A et H2B ne sont pas modifiées.

Ces résultats confirment la corrélation entre l'acétylation des histones et la structure et la fonction de la chromatine ; ils montrent aussi que transcription et replication du DNA sont associées à l'acétylation des histones mais à des degrés divers.

II - 2 PHOSPHORYLATION : VOIE MAJEURE DU CONTRÔLE DES ACTIVITES CELLULAIRES

La phosphorylation est l'un des moyens retenus par l'évolution pour modifier l'activité des protéines et contrôler les multiples activités de la cellule. C'est ainsi que, par exemple, chez les Eucaryotes, la phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 inhibe la synthèse protéique alors que la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 est associée à l'activité de translation, cette phosphorylation étant une condition préalable et nécessaire à l'activation de la synthèse protéique et non sa conséquence (CLEMENS, 1983).

Au sein du noyau, la superphosphorylation de l'histone H1 juste avant la mitose, apparaît comme une étape préliminaire nécessaire à l'initiation de la condensation des chromosomes (BRADBURY et coll., 1973-b ; MARKS et coll., 1973), de même que, dans la phase prémitotique, la phosphorylation de nombreuses protéines structurales formant la matrice nucléaire suggère un rôle important des phosphoprotéines dans les modifications structurales que subit la cellule au cours de la mitose (HENRY et HODGE, 1983).

La phosphorylation de nombreuses protéines de la cellule intervient au niveau de la fonction alcool des résidus de sérine ou/et de thréonine, par l'intermédiaire de différents

types de protéines kinases. Le groupe phénol de la tyrosine est également phosphorylable par une kinase spécifique. La présence de phosphotyrosine dans les protéines a été mise en évidence voici trois ans et bien que l'existence de cette modification dans les protéines nucléaires n'ait pas été prouvée jusqu'à présent, nous ne pouvons passer sous silence l'importance de cette modification dans les réactions en chaîne du métabolisme de la cellule.

II - 2-1 Protéines kinases : diversité et spécificité

L'activité protéine kinase est présente dans la plupart des tissus ou types cellulaires ; elle est associée aux différents compartiments de la cellule puisqu'elle a été mise en évidence dans le noyau, les mitochondries, les polysomes, le cytoplasme et la membrane plasmique . Elle semble ubiquitaire puisque sa présence a également été rapportée chez certains procaryotes : *Escherichia coli* (MANAI et COZZONE, 1979) , *Salmonella typhimurium* (WANG et KOSHLAND, 1978).

Les protéines kinases ont en commun la propriété de transférer le groupement phosphate en position γ de l'ATP à un acide aminé hydroxylé (sérine, thréonine ou tyrosine) ou à un acide aminé basique (lysine, histidine ou arginine); nos connaissances sur la phosphorylation des acides aminés basiques sont très limitées car la liaison P-N formée est labile

en milieu acide (CHEN et coll.,1974 ; SMITH et coll.,1976), milieu généralement utilisé pour extraire les histones de la chromatine; seuls les travaux de CHEN et de ses collaborateurs (1977) ont décrit la présence de phospholysine dans l'histone H1 et de phosphohistidine dans l'histone H4 et dans la suite de notre exposé nous nous limiterons à la phosphorylation des acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine) qui concerne une partie de nos travaux.

La régulation de l'activité ATP-protéine phosphotransférase se fait par différents mécanismes partiellement élucidés qui permettent de distinguer plusieurs sortes de protéines kinases :

- protéines kinases activées par les nucléotides cycliques
- protéines kinases non activées par les nucléotides cycliques.

- Protéines kinases activées par les nucléotides cycliques

C'est en 1968 que WALSH et ses collaborateurs mirent en évidence pour la première fois une protéine kinase activée par l'AMP cyclique, isolée du muscle de Lapin (WALSH et coll.,1968) tandis que deux ans plus tard, KUO et GREENGARD (1970) isolaient une protéine kinase activée par le GMP cyclique. La protéine kinase activée par l'AMP cyclique est principalement régulée par la concentration intracellulaire d'AMP cyclique ; en l'absence d'AMP cyclique, l'enzyme est inactif et l'augmentation

de la concentration en AMP cyclique provoque la dissociation de l'enzyme en une sous-unité régulatrice (R) qui contient le site de liaison de l'AMP cyclique et une sous-unité catalytique (C) active qui permet la liaison du substrat protéique au donneur de phosphate, l'ATP (DE LA HOUSSAYE et coll., 1983). Ainsi, selon JUNGSMANN et KRANIAS (1977), la dissociation de la protéine kinase activée par l'AMP cyclique, généralement localisée dans le cytoplasme, permettrait la phosphorylation de protéines nucléaires après translocation de ses sous-unités régulatrice et catalytique aux sites accepteurs dans le noyau. La protéine kinase activée par le GMP cyclique semble régulée par un mécanisme similaire à celui décrit pour la protéine kinase activée par l'AMP cyclique ; toutefois des différences d'activité de ces deux enzymes ont été rapportées dans plusieurs cas au cours du développement des insectes : *Ceratitidis capitata* (Mouche du fruit) (CATALAN et MUNICIO, 1974) et *Bombyx mori* (Bombyx du mûrier ou Ver à soie) (TAKAHASHI, 1976). Ces différences sont dues à une évolution non parallèle entre l'activité des kinases et des cyclases (adénylate ou guanylate) (CASTILLON et coll., 1973). La spécificité des kinases a même été un moment discutée : en effet, GLASS et KREBS en 1979 ont montré que les deux enzymes (AMP cyclique - et GMP cyclique -dépendants) phosphorylaient, à des taux différents il est vrai, les deux mêmes sites (sérines 32 et 36) d'un peptide synthétique correspondant à la séquence 29 à 39 de l'histone H2B. De même, dans la séquence de la HMG 14, la sérine en position 6 est un site de phosphorylation commun aux deux enzymes (WALTON et coll., 1982). D'autre

part, VARDANIS en 1980 a observé chez la Sauterelle, l'existence d'une kinase activée de la même façon par l'un ou l'autre des nucléotides cycliques et dont le substrat préférentiel est l'histone H2A. En fait, il semble que ces protéines kinases stimulées par les nucléotides cycliques (AMP ou GMP) aient une spécificité relative c'est-à-dire que dans un substrat, certains sites de phosphorylation peuvent être communs aux deux enzymes (sérine 37 de l'histone H1) tandis que d'autres sont spécifiques de l'une ou l'autre kinase (ZEILIG et coll., 1981).

Les protéines kinases dépendantes des nucléotides cycliques en particulier de l'AMP cyclique ont été isolées et caractérisées dans un certain nombre de tissus parmi lesquels le muscle de Lapin (WALSH et coll., 1968), le foie de Rat, le foie de Veau (LANGAN, 1969), le Ver à soie (HASHIMOTO et coll., 1975), le cerveau de Porc (SHLYAPNIKOV et coll., 1975), le cerveau de Boeuf (KURODA et coll., 1976), le pancréas de Rat (MANGEAT et coll., 1978) etc... Ces kinases ont permis de localiser les sites de phosphorylation dans les histones et c'est ainsi que l'on a déterminé la spécificité de chacune d'entre elles et montré l'importance de l'environnement des acides aminés dans les structures primaire et secondaire.

De plus, l'activité de ces protéines kinases est particulièrement importante dans les spermatozoïdes où l'effet stimulateur de l'AMP cyclique sur la mobilité des spermatozoïdes serait dû en partie à ces protéines kinases (MAJUMDER, 1978). Le rôle important des kinases activées par l'AMP cyclique est schématisé dans la figure 8.

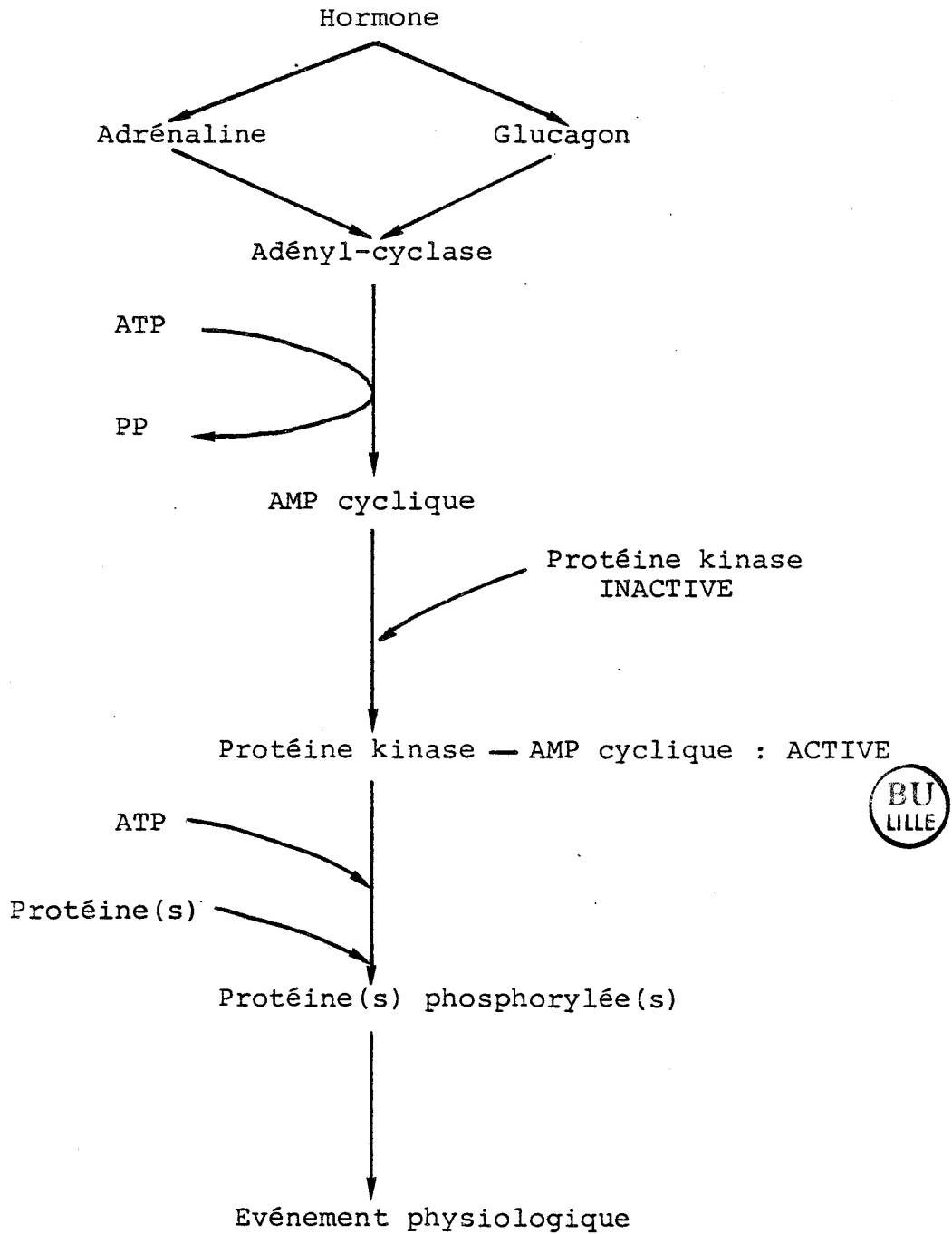


FIGURE 8 MECANISME D'ACTION DES PROTEINES KINASES
ACTIVEES PAR L'AMP CYCLIQUE

- Protéines kinases non activées par les nucléotides cycliques

Si certaines hormones (adrénaline, glucagon, par exemple) entraînent une augmentation du taux d'AMP cyclique et une activation des protéines kinases stimulables par ce nucléotide cyclique, d'autres hormones (telles que les hormones stéroïdes ou les hormones de la thyroïde) n'ont aucune action sur l'AMP cyclique et pourtant elles affectent la phosphorylation de protéines nucléaires et l'expression des gènes en stimulant, par un mécanisme encore inconnu, des protéines kinases qui ne sont donc pas activées par l'AMP cyclique (JUNGMANN et KRANIAS, 1977).

Parmi ces protéines kinases, certaines phosphorylent les phosphoprotéines telles que la caséine ou la phosphovitine ou encore des phosphoprotéines associées à la chromatine ; dans ce cas, les polycations tels que la polylysine, les histones ou les protamines sont des stimulateurs de l'activité kinasique mais non des substrats (YAMAMOTO et coll., 1979). Les sites phosphorylés par ces enzymes sont localisés dans des régions riches en acides aminés acides où on ne rencontre aucun acide aminé basique (SCULLEY et MACKINLAY, 1982).

D'autres protéines kinases non activées par les nucléotides cycliques ont pour substrat préférentiel les histones et certaines protéines non-histones. Plusieurs de ces enzymes ont été isolés et amenés à un très haut niveau de pureté de sorte que leur spécificité apparaît nettement. LAKE et SALZMAN (1972) furent les premiers à décrire dans les cellules CHO ("Chinese

Hamster Ovary) une protéine kinase responsable de la phosphorylation massive de l'histone H1. Simultanément, d'autres groupes de chercheurs mettaient en évidence une phosphorylation accrue de l'histone H1 dans les cellules du foie en régénération (SIEBERT et coll., 1971) et dans les cellules à division rapide (BALHORN et coll., 1972 ; GURLEY et coll., 1974 ; SCHLEPPER et KNIPPERS, 1975). L'enzyme responsable de cette phosphorylation intense est une protéine kinase liée à la chromatine, insensible à l'AMP cyclique, spécifique de l'histone H1 et dénommée kinase GR ("Growth-associated kinase") (LANGAN, 1978). Cet enzyme phosphoryle principalement des résidus de thréonine et à un degré moindre des résidus de sérine. Dans des expériences de phosphorylation effectuées *in vivo* et *in vitro*, les mêmes sites de phosphorylation ont été localisés dans les régions basiques N- et C-terminales de l'histone H1 (Figure 9) (LAKE, 1973, LANGAN, 1978). De plus, la phosphorylation de chacune des cinq sous-fractions de l'histone H1 de thymus de Rat par la kinase GR se traduit par une incorporation variable allant de 3 à 6 phosphates/molécule selon la sous-fraction considérée (LANGAN, 1982). Il semble que la spécificité de la kinase GR n'ait pas varié au cours de l'évolution puisque CHAMBERS et ses collaborateurs (1983) l'ont isolée de la moisissure *Physarum polycephalum* et ont montré qu'elle phosphorylait les mêmes sites que la kinase homologue de mammifères.

Plusieurs protéines kinases associées à la croissance et phosphorylant spécifiquement l'histone H1 ont été décrites dans

SITES DE PHOSPHORYLATION

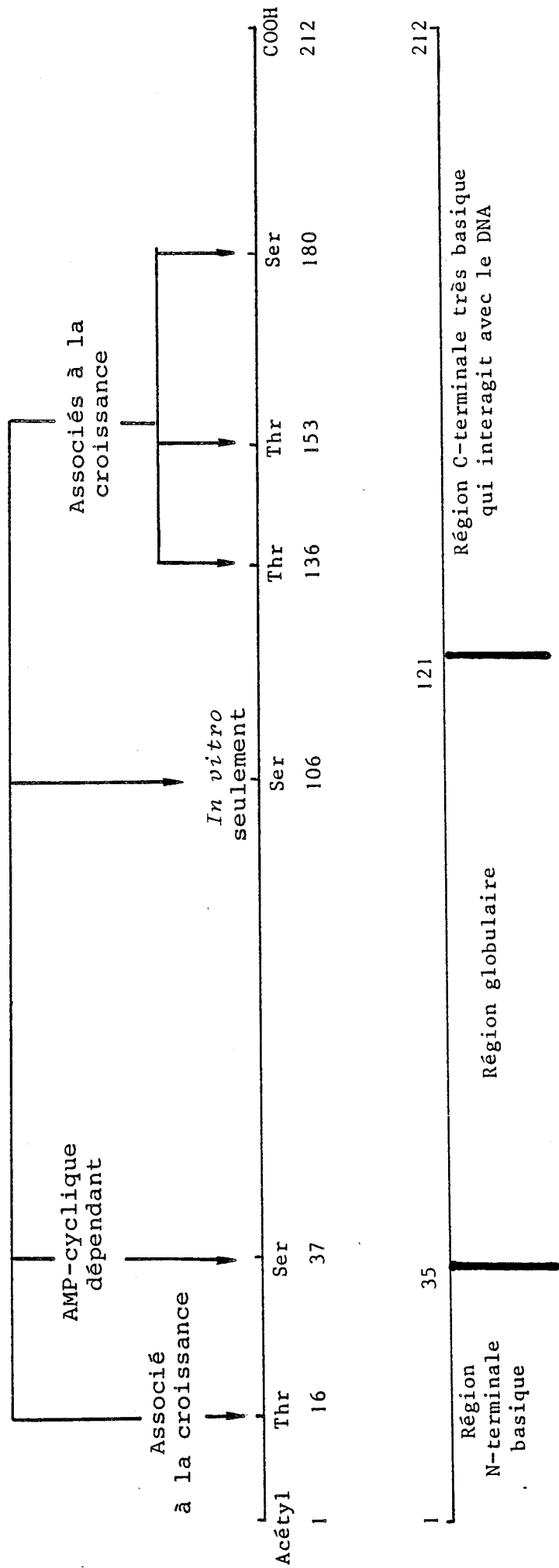


FIGURE 9 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX SITES DE PHOSPHORYLATION DANS LES DIFFERENTS DOMAINES STRUCTURAUX DE L'HISTONE H1.

les noyaux de cellules d'Eucaryotes ; parmi elles, une protéine kinase qui utilise le GTP plutôt que l'ATP est présente avec une grande activité dans les cellules à division rapide (plasmodytome, hépatome) et absente dans le foie normal (QUIRINSTRICKER et SCHMITT, 1981). Cette protéine kinase phosphoryle aussi très activement l'histone H5, histone qui présente de grandes analogies structurales avec l'histone H1 ; en fait, la spécificité de cette kinase est donc, au moins en partie, liée à la reconnaissance de séquences en acides aminés spécifiques (MARTINAGE et coll., 1981).

Une protéine kinase non activée par l'AMP cyclique, a été isolée de la chromatine de thymus de Boeuf, puis hautement purifiée ; cette kinase a une spécificité unique pour l'histone H3 qu'elle phosphoryle en un seul site (résidu de thréonine en position 3) (SHOEMAKER et CHALKLEY, 1980).

D'autres protéines kinases ont été isolées de différents tissus ou cellules mais leur degré de pureté est insuffisant pour parler de spécificité. Ainsi la protéine kinase nucléaire N II non activée par l'AMP cyclique phosphoryle préférentiellement la HMG 17 sur deux résidus de sérine (aux positions 24 et 28) et un résidu de thréonine (en position 76). En raison d'une homologie de séquence avec la HMG 14 autour des résidus de sérine phosphorylés, la protéine kinase N II pourrait phosphoryler également la HMG 14 sur deux résidus de sérine (HARRISON et JUNGSMANN, 1982). La phosphorylation *in vivo* des protéines HMG chez le protozoaire cilié *Tetrahymena* met en oeuvre au moins deux

types de protéines kinases : une kinase indépendante de l'AMP cyclique de type N II qui phosphoryle des résidus de sérine et de thréonine dans la HMG-D (équivalente à la HMG 17 de thymus de Veau) et une kinase activée par l'AMP cyclique qui phosphoryle uniquement des résidus de sérine dans les HMG-A et -B (correspondant respectivement à HMG 1 et HMG 2) (LEVY-WILSON et coll., 1983). L'étude comparée de la phosphorylation des HMG dans des cellules en phase exponentielle de croissance et dans des cellules ayant atteint la phase stationnaire suggère l'existence d'une nouvelle kinase associée à la croissance dont le substrat serait les protéines HMG 14 et 17 et non HMG 1 et 2 (SAFFER et GLAZER, 1982).

Pour leur activation, les protéines kinases nécessitent la présence d'effecteurs parmi lesquels figurent le calcium, les phospholipides. Ainsi, dans les noyaux de cellules Hela, une micromole de calcium stimule la phosphorylation de l'histone H3 par une protéine kinase endogène (WHITLOCK et coll., 1983).

Un autre type de protéine kinase nécessite pour être actif, la présence simultanée de calcium et de phospholipide, l'activation de l'enzyme étant directement reliée au turnover du phosphatidylinositol. Cette protéine kinase phosphoryle activement l'histone H1 et particulièrement des résidus de sérine ou de thréonine localisés dans la partie C-terminale de la protéine (IWASA et coll., 1980).

Très récemment, DE LA HOUSSAYE et ses collaborateurs (1983) ont isolé de cellules de lymphosarcome, une kinase spécifique de l'histone H4, dans sa forme inactive ; ces auteurs ont montré que l'activation de l'enzyme se faisait par protéolyse de la kinase (par une protéase endogène) dans une réaction nécessitant ATP et magnésium.

La régulation des ATP-protéines phosphotransférases est essentielle à la cellule ; elle nécessite à certains moments l'inactivation des kinases pour éviter une utilisation futile de l'ATP. De la même façon qu'une protéine cytoplasmique stable à la chaleur inhibe spécifiquement les protéines kinases stimulées par l'AMP cyclique, la présence d'un inhibiteur sensible à la chaleur, spécifique des protéines kinases nucléaires a été rapportée dans les noyaux de foie de Rat (FARRON-FURSTENTHAL, 1979).

Toutefois, à l'heure actuelle, on ne sait pas comment les différents mécanismes d'activation et d'inactivation des kinases et des phosphatases sont coordonnés au niveau de la cellule.

II - 2-2 La phosphorylation au cours du cycle cellulaire

Les travaux réalisés sur la phosphorylation des protéines au cours du cycle cellulaire nécessitent une synchronisation préalable des cellules soit par détachement sélectif des cellules en mitose, soit par addition d'un agent bloquant

(hydroxyurée, cycloheximide, colcemide) ; mais la difficulté à synchroniser les cellules particulièrement en phase G2 ainsi que le risque de réactions secondaires a souvent conduit à l'utilisation de cellules naturellement synchrones isolées du plasmodium *Physarum polycephalum* qui constituent un matériel de choix.

Tandis que les histones H2A, H2B, H4 sont phosphorylées tout au long du cycle cellulaire, l'histone H3 est phosphorylée uniquement pendant la mitose et l'histone H1 est phosphorylée pendant l'interphase, plus particulièrement en phase S (H1_{Int.}) et "superphosphorylée" pendant la mitose (H1_{Mit.}) (GURLEY et coll., 1975).

L'augmentation de la phosphorylation de l'histone H1 au moment de la synthèse du DNA, c'est-à-dire en phase S, a été observée pour la première fois par ORD et STOCKEN en 1967. Quelques années plus tard, en mesurant le taux d'incorporation de $[^{32}\text{P}]$ dans des cellules, BALHORN et ses collaborateurs (1972) établirent une relation entre la phosphorylation de l'histone H1 et la croissance cellulaire. Par ailleurs, en utilisant les cellules naturellement synchrones de *Physarum polycephalum*, BRADBURY et ses collaborateurs (1973-b) ont observé une phosphorylation maximale de l'histone H1 à la fin de la phase G2. Cette "superphosphorylation" de l'histone H1 est liée non pas à la synthèse d'enzyme mais à "l'activation" de protéines kinases préexistantes (MITCHELSON et coll., 1978). L'activité des enzymes déduite de la quantité de $[^{32}\text{P}]$ incorporée est 15 fois plus importante durant la phase G2 et diminue

très rapidement dès la prophase (BRADBURY et coll.,1974) pour atteindre un minimum durant la phase S. Ces kinases qui phosphorylent des résidus de sérine et de thréonine, et qui modifient l'histone H1 dans les régions N- et C-terminales sont des kinases associées à la croissance (kinases GR). L'augmentation de l'activité de ces kinases a été observée dans un grand nombre de cellules eucaryotiques (LAKE et SALZMAN,1972) au moment de la condensation des chromosomes (BRADBURY et coll.,1974 ; INGLIS et coll.,1976 ; GURLEY et coll.,1978-b ; MATSUMOTO et coll.,1980) et de l'arrêt de la transcription.

Ceci a conduit BRADBURY et MATSUMOTO à établir une relation de cause à effet entre la superphosphorylation de l'histone H1 et l'initiation de la condensation de la chromatine. Plusieurs arguments sont en faveur de cette thèse qui n'a cependant pas été vraiment démontrée. Si une préparation de kinase partiellement purifiée est ajoutée à des cellules de *Physarum polycephalum*, la mitose peut être avancée d'un temps qui varie avec la quantité de kinase ajoutée et qui peut atteindre une heure (BRADBURY et coll.,1974). D'autre part, quand la mitose se termine et que les cellules entrent en phase G1, l'histone H1 est rapidement déphosphorylée (GURLEY et coll.,1974). Un autre argument en faveur du rôle important de la phosphorylation de l'histone H1 dans la condensation des chromosomes est apporté par l'existence d'un mutant d'une lignée cellulaire de mammifères déficient en kinase GR qui contrôle l'initiation de la mitose: ce mutant est bloqué à la fin de la phase G2 (MATSUMOTO et coll.,1980).

Cependant, en empêchant la condensation des chromosomes par addition d'émétine, inhibiteur de la synthèse protéique, KRYSTAL et POCCIA (1981) ont observé une hyperphosphorylation de l'histone H1 identique à celle de cellules témoins ; ceci suggère que, si l'hyperphosphorylation de H1 est nécessaire à la formation des chromosomes mitotiques, elle n'est pas suffisante pour provoquer la condensation de la chromatine. Cette observation a été confirmée par l'étude de la phosphorylation de sous-fractions de l'histone H1 isolée de trois lignées cellulaires de Hamster chinois : il n'apparaît aucune relation rigoureuse entre la phosphorylation de la région N-terminale (localisée sur un résidu de thréonine pendant la mitose) d'une sous-fraction particulière et l'initiation de la mitose. (WILKINSON et coll., 1982).

Des observations récentes accordent un rôle primordial à la phosphorylation de l'histone H3 dans la condensation de la chromatine. L'induction d'une condensation prématurée des chromosomes (PCC) à 40°5 chez un mutant sensible à la température (mutant ts BN2 de cellules du rein de Hamster) provoque la même phosphorylation des histones H1 et H3 que celle observée au cours de la mitose ; en présence de cyclohexamide qui inhibe la PCC, la phosphorylation de l'histone H1 est seulement légèrement inhibée tandis que l'histone H3 n'est pas du tout phosphorylée (AJIRO et coll., 1983). Ce travail est à rapprocher de celui de KRYSTAL et POCCIA (1981) qui montre que l'histone H1 est phosphorylée même lorsque la condensation des chromosomes est inhibée ; la phosphorylation de

l'histone H3 serait plus spécifiquement impliquée à la fois dans la condensation prématurée des chromosomes et dans la condensation des chromosomes mitotiques que ne le serait l'histone H1.

Le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* constitue un autre matériel de choix pour explorer la relation possible entre phosphorylation et structure et fonction de la chromatine. Ce protozoaire contient un macro- et un micro-noyau : le macro-noyau se divise de manière amitotique et est transcriptionnellement actif ; le micro-noyau se divise par mitose et est transcriptionnellement inactif (GOROVSKY et coll., 1977) ; ainsi, la phosphorylation associée à la mitose sera spécifique du micro-noyau. Des travaux de ALLIS et GOROVSKY en 1981, il apparaît que la phosphorylation de l'histone H3 serait plus spécifiquement associée à la mitose puisque cette histone est modifiée uniquement dans les micro-noyaux ; par contre, l'histone H1 est modifiée à la fois dans le micro- et le macro-noyau, et le rôle attribué à la modification de cette histone chez *Tetrahymena* n'est pas clair. De plus, si les phosphatases sont inhibées par addition de chlorure de zinc, l'histone H1 reste hyperphosphorylée lorsque les cellules quittent la mitose pour entrer en phase G1 tandis que l'on observe parallèlement une décondensation de la chromatine (TANPHAICHITR et coll., 1976) ; la déphosphorylation n'est donc pas nécessaire à la décondensation.

En résumé, la superphosphorylation de l'histone H1 en relation avec une augmentation de l'activité des kinases en fin de phase G2 et la condensation des chromosomes sont deux événements liés dans le temps :

- en l'absence de superphosphorylation de l'histone H1, les cellules sont bloquées en fin de phase G2 : il n'y a pas de mitose.

- si la condensation des chromosomes est inhibée, il y a quand même hyperphosphorylation de l'histone H1.

Ces deux faits indiquent que la phosphorylation de l'histone H1 est nécessaire à l'initiation de la condensation des chromosomes. Par contre, sa déphosphorylation n'est pas nécessaire à la décondensation.

Enfin, la phosphorylation de l'histone H3 qui a lieu uniquement pendant la mitose pourrait jouer, comme l'histone H1, un rôle important dans la structure de la chromatine.

II - 2-3 Importance de la phosphorylation dans la structure de la chromatine

La phosphorylation des histones et des protéines non-histones diminue les interactions ioniques de ces protéines avec le DNA et modifie les interactions des protéines entre elles.

La phosphorylation *in vitro* des histones H2B et H3 en présence d'une kinase de muscle de Lapin diminue légèrement les constantes d'association des complexes H2A-H2B et H4-H2B ; par contre, la diminution est beaucoup plus importante pour le complexe H3-H4 (SZOPA et coll., 1980) qui ne contient pourtant que deux sites de phosphorylation (sérine 10 de l'histone H3 et sérine 47 de l'histone H4) alors que le complexe H2A-H2B en contient quatre (sérine 1 et 19 de l'histone H2A ; sérine 32 et 36 de l'histone H2B).

La mesure de la vitesse de sédimentation et l'étude du spectre dichroïque de l'octamère d'histones phosphorylé et non phosphorylé ne révèlent aucune différence, et par conséquent, la phosphorylation des histones ne semble pas modifier la conformation de l'octamère (SZOPA et coll., 1980).

Selon GURLEY et ses collaborateurs (1978-a), différents types de phosphorylation pourraient être reliés à différents niveaux d'organisation de la chromatine:

- la phosphorylation de l'histone H2A est fonction de la quantité d'hétérochromatine : ceci a été observé dans deux lignées cellulaires de Souris *Peromyscus crinitus* et *Peromyscus eremicus* qui ont la même quantité d'euchromatine mais diffèrent par la quantité d'hétérochromatine. L'espèce *Peromyscus eremicus* qui contient le plus d'hétérochromatine présente une phosphorylation accrue de l'histone H2A tandis que la phosphorylation de l'histone H1 est identique dans les deux lignées cellulaires.

- durant l'interphase, l'histone H1_{Int} renferme 1 à 3 groupes phosphate; les sites de phosphorylation sont uniquement des résidus de sérine localisés dans la partie C-terminale de la protéine. L'apparition de H1_{Int} coïncide avec une réorganisation de la chromatine au niveau moléculaire qui intervient avant que la cellule ne se divise.
- durant la métaphase, toutes les molécules d'histone H1 sont superphosphorylées : la H1_{Met} renferme 4 à 6 groupes phosphate. Les acides aminés modifiés sont à la fois des résidus de sérine et des résidus de thréonine; ils sont localisés dans les régions N- et C-terminales de la protéine. Simultanément, l'histone H3 est phosphorylée.

La phosphorylation de l'histone H1 (H1_{Met}) et de l'histone H3 est un événement associé dans le temps à la condensation des chromosomes. Ces histones pourraient exercer sur la chromatine quelque contrainte structurale qui empêcherait sa condensation en chromosomes ; la phosphorylation de ces protéines supprimerait cette contrainte, permettant ainsi l'organisation des chromosomes. Selon cette hypothèse, la phosphorylation des histones H1 et H3 ne serait pas directement responsable de la condensation des chromosomes mais serait plutôt une étape nécessaire dans le processus de la condensation (GURLEY et coll., 1978-b).

Un des facteurs responsable de la condensation de la chromatine pourrait être la concentration intracellulaire en magnésium; la superphosphorylation de l'histone H1 résulterait alors

d'une augmentation de la concentration en ions Mg^{++} qui activerait une kinase spécifique de l'histone H1 (JERZMANOWSKI et STARON, 1981).

La compaction du DNA peut être assurée par des protéines particulières comme les protamines qui au cours de la spermiogénèse remplacent progressivement les histones et subissent une phosphorylation puis une déphosphorylation lors de la transition spermatides \longrightarrow spermatozoïdes, phase ultime de la maturation de la chromatine du gamète (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1978).

La structure de la chromatine a été étudiée dans les noyaux en interphase et dans les chromosomes en métaphase isolés de cellules Hela en employant la diffraction des rayons X. (PAULSON et LANGMORE, 1983). Ces auteurs montrent que la modification de structure de la chromatine au moment de la métaphase affecte seulement l'empilement des fibres de chromatine et non la structure interne du nucléosome ou l'assemblage des nucléosomes dans la fibre de chromatine ; en particulier, la phosphorylation des histones H1 et H3 à la mitose n'affecte pas la structure de la fibre de chromatine. Ce résultat est surprenant : la phosphorylation des histones n'affecte peut-être pas la structure interne des fibres de chromatine mais interviendrait plutôt pour promouvoir ou inhiber les interactions entre les fibres elles-mêmes ou entre les fibres et d'autres composants cellulaires.

Selon BRADBURY et MATTHEWS (1982), la condensation des chromosomes implique une organisation d'ordre supérieur de la fibre de 34 nm et cette transition serait contrôlée par la

phosphorylation de l'histone H1, mais la question de savoir si l'histone H1 est seule à intervenir et comment elle permet la transition de structure de la chromatine reste posée. Vraisemblablement des modifications autres que la phosphorylation (acétylation, ADP-ribosylation) qui affectent les histones et des protéines non-histones participent à l'évolution de la structure de la chromatine au cours du cycle cellulaire.

II - 2-4 Relation phosphorylation-acétylation

L'acétylation et la phosphorylation sont deux modifications qui affectent les histones après leur synthèse et qui ont un rôle important dans la structure et la fonction de la chromatine.

A ce jour, quelques travaux ont été réalisés pour rechercher une éventuelle relation entre ces deux modifications. Pour cela, les auteurs ont employé le plus souvent des cellules traitées au butyrate de sodium. Cet acide gras à courte chaîne inhibe les déacétylases et provoque par conséquent une hyperacétylation des core histones et en particulier des histones H3 et H4.

C'est en 1980 que WHITLOCK et ses collaborateurs observèrent que l'augmentation de l'acétylation des histones dans des cellules Hela traitées au butyrate, entraînait de façon sélective une susceptibilité accrue de l'histone H3 à la phosphorylation par une kinase endogène. Une corrélation entre le degré d'acétylation et de phosphorylation de l'histone H3 apparaît

alors; plus précisément, l'acétylation de cette protéine augmenterait son accessibilité à une kinase endogène stimulée par le calcium (WHITLOCK et coll.,1983).

Cependant, il faut interpréter avec prudence, les résultats obtenus à partir de cellules traitées au butyrate. Par exemple, la phosphorylation des protéines HMG 14 et 17 est réduite de 30 et 70 p.100 respectivement, dans des cellules d'ascite d'Ehrlich traitées au butyrate mais parallèlement la synthèse de ces protéines est inhibée (SAFFER et GLAZER,1982). Le butyrate de sodium induit, en effet, de profonds changements dans la morphologie et la croissance de la cellule ; il bloque le cycle cellulaire en phase G1, ce qui se traduit par une déphosphorylation de l'histone H1 (D'ANNA et coll.,1980).

En fait, pour l'étude des relations acétylation-phosphorylation, le plasmodium *Physarum polycephalum* dont les cellules sont naturellement synchrones constitue un matériel de choix. L'acétylation de l'histone H4 peut être suivie tout au long du cycle cellulaire et la forme tétraacétylée de cette histone est liée à l'activité de transcription biphasique (en phase S et au milieu de la phase G2). Cette hyperacétylation destabiliserait la fibre de 34 nm et conduirait à une conformation plus étendue. Inversement, la déacétylation de l'histone H4 conduirait à la formation de la fibre de 34 nm observée à la mitose. La phosphorylation de l'histone H1 serait probablement impliquée dans l'empilement de ces fibres pour former une structure d'ordre supérieur (Figure 10). Ainsi, l'acétylation de l'histone H4 serait inversement reliée à la phosphorylation de l'histone H1. (CHAHAL et coll.,1980).

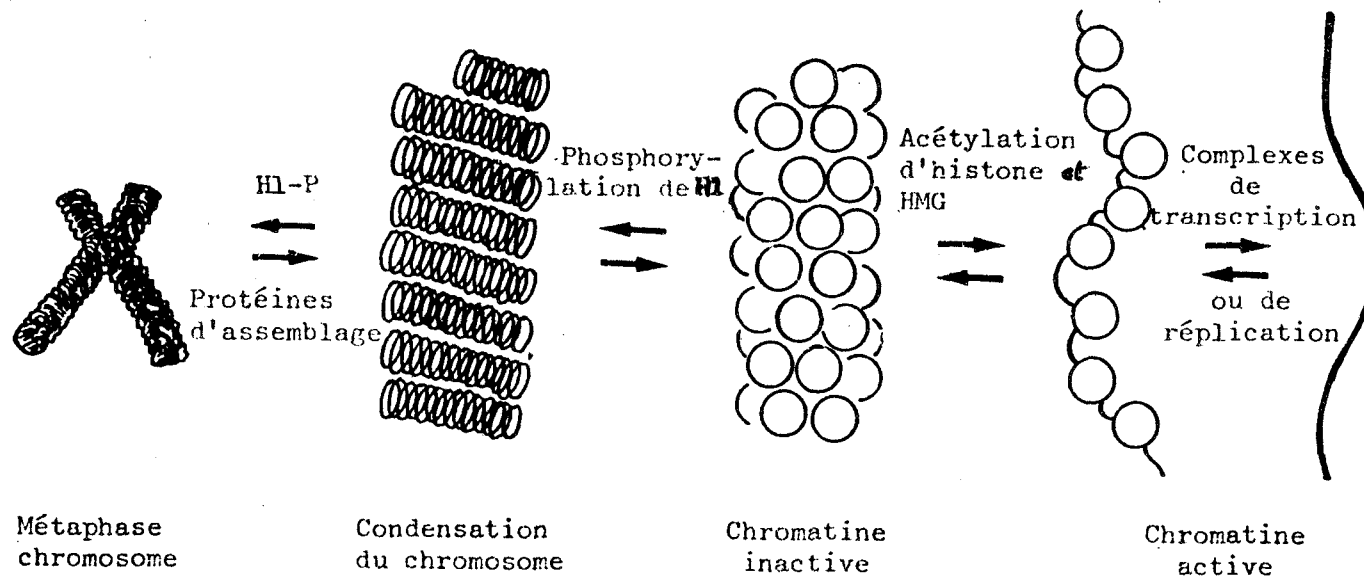


FIGURE 10 MODELE REPRESENTANT LES TRANSITIONS STRUCTURALES MAJEURES DE LA CHROMATINE

Ce modèle montre, de la droite vers la gauche, l'organisation progressive de la fibre chromatinienne en des structures d'ordre supérieur qui aboutissent à la condensation du chromosome métaphasique. On notera l'influence de la phosphorylation de H1 dans la condensation du chromosome et l'acétylation de H4 dans le passage de la chromatine inactive en la chromatine active.

Selon CHAHAL, S.S., MATTHEWS, H.R. et BRADBURY, E.M. (1980) Nature, 287, 76-79.



II - 2-5 Phosphorylation de la tyrosine : nouveau type de modification des protéines

Découverte récemment, la phosphorylation de résidus de tyrosine est une nouvelle forme de modification des protéines (HUNTER et SEFTON, 1980). Elle met en oeuvre une protéine kinase particulière, spécifique de la tyrosine tandis que les autres protéines kinases connues transfèrent le phosphate sur des résidus de sérine et/ou de thréonine.

Outre l'AMP cyclique nécessaire à l'activité de certaines protéines kinases, il existe de nombreux effecteurs modifiant le degré de phosphorylation des protéines; parmi ceux-ci citons des hormones polypeptidiques comme l'insuline, le glucagon, les facteurs de croissance EGF ou "epidermal growth factor", PDGF ou "platelet derived growth factor", le calcium, l'interféron, certains virus.....

De nombreux travaux ont montré que la liaison de l'insuline à son récepteur membranaire stimulait la phosphorylation de ce dernier (VAN OBBERGHEN et KOWALSKI, 1982; KASUGA et coll., 1982; ROSEN et coll., 1983). Cette phosphorylation serait la première étape d'une succession d'événements biochimiques permettant le transfert du signal de l'insuline; les récepteurs de plusieurs facteurs de croissance : EGF (COHEN et coll., 1980), PDGF (EK et coll., 1982) sont également phosphorylés. La phosphorylation de ces récepteurs membranaires est liée à l'activation d'une protéine kinase qui serait, soit très étroitement liée au récepteur, soit le récepteur lui-même. Cette classe de protéine kinase qui

phosphoryle spécifiquement la tyrosine est liée paradoxalement à la régulation de la croissance normale et néoplasique car elle est associée aux récepteurs des facteurs de croissance mais aussi à la transformation virale: ainsi l'expression du gène oncogène "src" du virus du sarcome de Rous se traduit par la synthèse d'une phosphoprotéine de masse moléculaire 60.000 appelée: pp60v-src (v-src indiquant que son origine est le gène viral src) (HUNTER et SEFTON,1980). Cette protéine est une phosphotyrosine kinase concentrée dans les plaques d'adhésion de la membrane cellulaire où elle phosphoryle une protéine, la vinculine ; la vinculine phosphorylée se disperse dans toute la cellule à la suite de la transformation par le gène src et il semble que la phosphorylation de cette protéine accélère la destruction des plaques d'adhésion observée dans la cellule cancéreuse (Figure 11) (HUNTER,1982).

D'autres protéines telles que des enzymes de la glycolyse sont également phosphorylées sur des résidus de tyrosine dans les cellules transformées par le virus du sarcome de Rous (COOPER et coll.,1983) mais le rôle de ces modifications structurales dans la régulation de la glycolyse n'est pas connu.

La phosphotyrosine représente seulement 0.05 p.100 du phosphate stable en milieu acide dans les protéines cellulaires (HUNTER,1982) mais cette quantité est multipliée par un facteur 10 à la suite de la transformation virale de la cellule ; toutefois ce taux encore faible de phosphotyrosine explique sa mise en évidence tardive bien que son rôle semble fondamental dans la croissance cellulaire normale au cours de l'embryogénèse (DASGUPTA et GARBERS,1983), sous l'action de certaines

- 1 Le virus du sarcome de Rous pénètre dans la membrane plasmique.
- 2 Action de la transcriptase reverse.
- 3 Intégration du vDNA dans le DNA cellulaire.
- 4 Transcription du provirus.
- 5 Translation du gène src.
- 6 pp60^{src}, tyrosine protéine kinase liée à la membrane plasmique et concentrée dans les plaques d'adhésion.
- 7 pp60^{src} phosphoryle la vinculine: les microfilaments se dispersent dans la cellule.
- 8 Destruction des plaques d'adhésion.

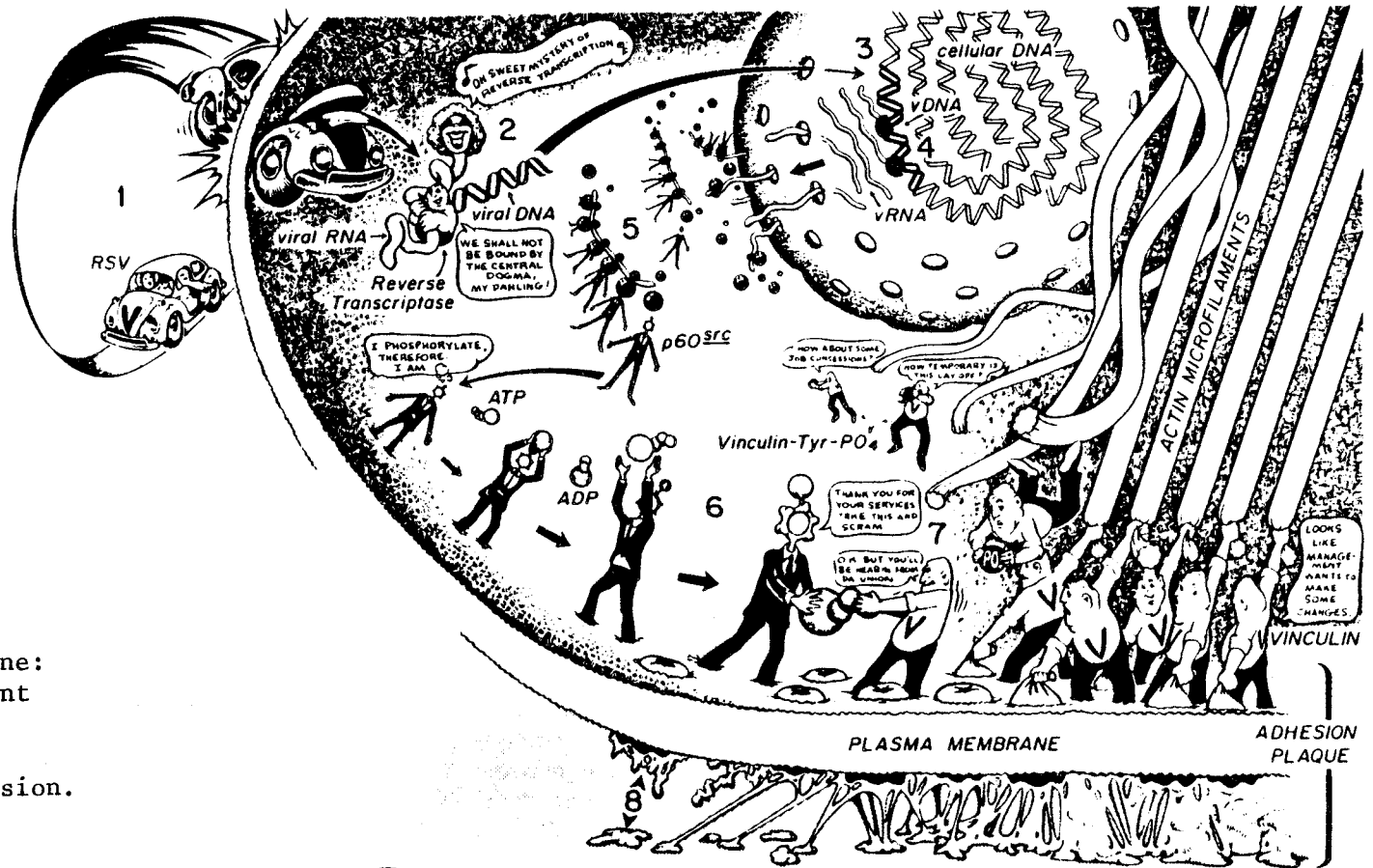


FIGURE 11 MECANISME D'ACTION DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE INDUITE PAR LE VIRUS DU SARCOME DE ROUS

Selon HUNTER, T. (1982) Trends Biochem.Sci., 7, 246-249.

hormones ou facteurs de croissance et dans la transformation cellulaire induite généralement par des retrovirus.

La découverte récente de phosphotyrosine kinases (et parallèlement de phosphotyrosine phosphatases: BRAUTIGAN et coll., 1981; HÖRLEIN et coll., 1982; FOULKES et coll., 1983) associées à la multiplication cellulaire a suscité un nombre impressionnant de travaux qui augmentent de jour en jour le nombre des protéines de la membrane plasmique et du cytosquelette ainsi modifiées. Toutes les phosphotyrosine kinases isolées à ce jour sont des protéines cytoplasmiques et la plupart d'entre elles possède au moins un résidu de tyrosine phosphorylé ainsi qu'un ou plusieurs résidus de phosphosérine, ce qui pourrait impliquer une régulation des différents métabolismes cellulaires par une phosphorylation en cascade des protéines, liée à l'action de phosphotyrosine et phosphosérine kinases (HUNTER, 1982).

L'universalité de cette modification protéique doit cependant encore être démontrée: si, outre les protéines cytoplasmiques dont nous avons brièvement parlé, des protéines nucléaires comme les histones (en particulier, l'histone H2B) sont de bons substrats pour les phosphotyrosine kinases (PETRUZZELLI et coll., 1982; ZICK et coll., 1983), si l'existence de phosphotyrosine a été observée chez *Escherichia coli*, il reste cependant beaucoup à apprendre dans ce domaine et l'emploi d'anticorps anti-O-phosphotyrosine (ROSS et coll., 1981) permettra sans aucun doute la découverte de nouveaux substrats cytoplasmiques mais aussi peut-être nucléaires pour ces enzymes dont nous ne faisons qu'entrevoir le rôle fondamental dans la multiplication cellulaire normale et dans la transformation cellulaire induite par les retrovirus.

II - 3 METHYLATION

La découverte d'acides aminés méthylés dans les histones remonte aux travaux de MURRAY en 1964. Cette modification des histones a lieu dans le noyau, à la fin de la phase S et pendant la phase G2 (LEE et coll., 1973). Elle est catalysée par des méthyltransférases hautement spécifiques qui transfèrent le groupe méthyl de la S-adénosylméthionine sur les histones riches en arginine H3 et H4. La méthylase III caractérisée par PAIK et KIM en 1971 transfère le groupement méthyl sur le groupe ϵ -aminé de résidus de lysine. Tandis que l'histone H4 ne possède qu'un seul résidu de lysine méthylé (en position 20), l'histone H3 en contient deux (aux positions 9 et 27) (DE LANGE et coll., 1973). Dans l'histone H3, les trois dérivés N-méthylés (mono-, di- et triméthyllysine) sont présents aux sites 9 et 27; l'histone H4, par contre, ne renferme pas de triméthyllysine : en position 20, on trouve 25 p.100 de monométhyllysine et 75 p.100 de diméthyllysine. De plus, si on considère que 60 p.100 des résidus de lysine en position 16 sont acétylés, l'histone H4 de thymus de Veau peut être présente sous quatre formes différentes selon le degré d'acétylation et de méthylation des résidus de lysine en position 16 et 20 respectivement (OGAWA et coll., 1969). Par contre, l'histone H4 isolée du Pois n'est pas du tout méthylée (DE LANGE et coll., 1969).

D'autres acides aminés peuvent être méthylés : ainsi, la 3-méthylhistidine et la N^ω-méthylarginine ont été identifiées dans les histones de différentes origines (BYVOET, 1971). Dans les protéines chromosomales non-histones, l'arginine apparaît comme un site préférentiel de méthylation et jusqu'à 8,2 p.100 de cet acide aminé sont présents sous forme de diméthylarginine dans la protéine HMG-2 de thymus de Veau (BOFFA et coll., 1979).

La méthylation, comme l'acétylation et la phosphorylation, modifie des acides aminés localisés dans la région N-terminale basique des histones : ainsi, la méthyllysine, en position 9 dans l'histone H3, est située à côté d'un site de phosphorylation (sérine 10) et d'acétylation (lysine 14). Cependant, alors que l'acétylation et la phosphorylation diminuent les interactions de l'histone avec le DNA, la méthylation, au contraire, semble augmenter l'affinité de l'histone pour le DNA (BYVOET et BAXTER, 1975) tout en modifiant l'hydrophobicité de la molécule. Les changements dans les interactions histone-histone et histone-protéine non-histone induits par la méthylation seraient impliqués dans la réorganisation de la chromatine au moment de la condensation (PAIK et KIM, 1980).

II - 4 ADP-RIBOSYLATION

II - 4-1 Généralités

L'ADP-ribosylation est une modification des protéines, catalysée par un enzyme : la poly (ADP-ribose) polymérase et nécessitant le NAD comme coenzyme. Dans cette réaction, l'adénosine diphosphate ribose (ADP-ribose) libéré du NAD par une glycohydrolase est transféré à un accepteur protéique sous forme monomérique ou polymérique (HAYAISHI,1976) (Figure 12).

Le premier exemple d'ADP-ribosylation des protéines remonte à 1968 lorsque HONJO et ses collaborateurs montrèrent que le facteur 2 d'élongation (EF-2), enzyme impliqué dans la synthèse protéique, est inactivé par la toxine diphtérique en présence de NAD ; l'inactivation de l'enzyme résulte de son ADP-ribosylation catalysée par le fragment actif (fragment A) de la toxine (Figure 13).

Chez les Eucaryotes, histones et protéines non-histones peuvent être ADP-ribosylées par fixation soit de mono (ADP-ribose) (cas le plus fréquent), soit de chaînes de poly (ADP-ribose) (HAYAISHI et UEDA, 1977) pouvant atteindre 65 unités d'ADP-ribose (TANAKA et coll., 1978).

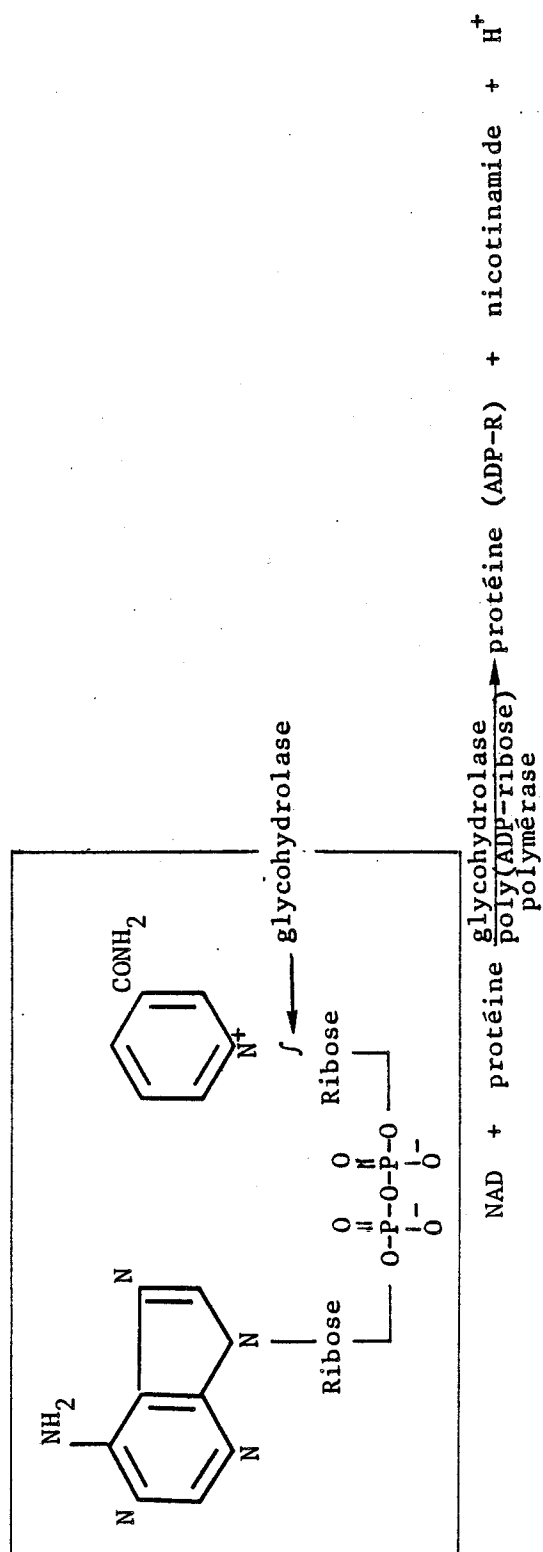
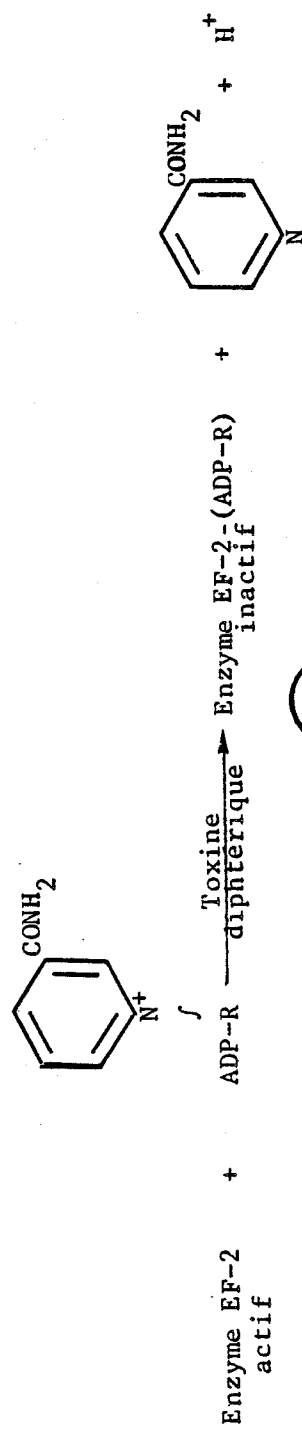


FIGURE 12 ADP-RIBOSYLATION DES PROTEINES



BU
LILLE

FIGURE 13 ADP-RIBOSYLATION DU FACTEUR 2 D'ELONGATION PAR LA TOXINE DIPHTERIQUE

L'ADP-ribose ou le poly (ADP-ribose) est lié aux histones par un pont ester entre le ribose terminal et le groupe γ -COOH de l'acide glutamique (histones H1 et H2B) (BURZIO et coll., 1979) ou le groupe α -COOH de l'acide aminé en position C-terminale (histone H1) (OGATA et coll., 1980-b). D'autres acides aminés peuvent être modifiés par ADP-ribosylation. En 1975, SMITH et STOCKEN ont observé la présence d'ADP-ribose lié de façon covalente à un résidu de phosphosérine dans l'histone H1. Plus récemment, une ADP-ribosyltransférase qui modifie l'arginine a été identifiée dans le foie de Rat (MOSS et STANLEY, 1981).

Bien que plusieurs acides aminés peuvent être ADP-ribosylés (acide glutamique, lysine, histidine, arginine et phosphosérine), l'ADP-ribosyltransférase est spécifique d'un acide aminé et par conséquent, une famille d'ADP-ribosyltransférases doit être présente dans la cellule. La liaison de l'ADP-ribose à son accepteur protéique est labile en milieu alcalin (NaOH 0.1M, 60 minutes, 37°C) mais deux types de liaison peuvent être différenciés suivant leur sensibilité à l'hydroxylamine 1M à pH 7.0 (BREDEHORST et coll., 1978).

II - 4-2 Protéines ADP-ribosylées

La poly (ADP-ribose) polymérase est un enzyme étroitement lié à la chromatine dans les régions internucléosomales (GIRI et coll., 1978). De par sa localisation, cet enzyme modifie préférentiellement l'histone H1 (WONG et coll., 1977 ;

RIQUELME et coll.,1979 ; OGATA et coll.,1980-b), l'histone H2B est également un bon substrat pour l'ADP-ribose polymérase (GIRI et coll.,1978 ; BURZIO et coll.,1979) ; les histones H2A et H3 sont, dans quelques cas, légèrement modifiées (POIRIER et SAVARD,1980) ; l'histone H4 n'a jamais été trouvée ADP-ribosylée. L'histone H5 et certaines protéines HMG sont également modifiées (POIRIER et coll.,1982-a ; TANUMA et JOHNSON, 1983 ; LEVY-WILSON et coll.,1983).

L'histone H1 est ADP-ribosylée dans les régions basiques N- et C-terminales : dans la région N-terminale, l'ADP-ribose est lié par un pont ester au groupe γ -COOH des résidus d'acide glutamique en position 2 et 14 ; dans la région C-terminale, l'ADP-ribose est lié au groupe α -COOH du résidu de lysine en position C-terminale de la protéine (OGATA et coll.,1980-b). Les cinq sous-fractions de l'histone H1 de foie de Rat sont modifiées par fixation d'oligomères d'ADP-ribose dont la longueur moyenne de la chaîne correspond au trimère (RIQUELME et coll.,1979). L'importance de la modification est fonction de la concentration en NAD et environ 60 p.100 des molécules de H1 sont modifiées à une concentration 1 mM en NAD. En séparant les sous-fractions de l'histone H1 par chromatographie d'immunoabsorption (anticorps poly (ADP-ribose) lié à du Sepharose), il est apparu que les sous-fractions de H1 ADP-ribosylées sont très accessibles à la phosphorylation par une protéine kinase nucléaire ; ceci serait en faveur d'une modification coordonnée de certaines molécules de H1 à la fois par phosphorylation et ADP-ribosylation.

Outre les différents degrés de phosphorylation des sous-fractions de l'histone H1, la présence d'oligomères d'ADP-ribose introduit une microhétérogénéité supplémentaire qui peut être facilement mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique classique de PANYIM et CHALKLEY (1969). Dans ce système, la mobilité de l'histone H1 peut être réduite de 20 p.100 par rapport à l'histone H1 non modifiée, selon la taille de l'oligomère ADP-ribose fixé sur la protéine.

Un complexe de deux molécules d'histones H1 pontées par une chaîne de 15 unités d'ADP-ribose a été caractérisé dans les noyaux de cellules Hela (STONE et coll., 1977). Un complexe similaire a été observé *in vitro* par ADAMIETZ et ses collaborateurs en 1978, et les agents qui condensent la chromatine tels les polyamines ou les cations divalents (Ca^{++} , Mg^{++}) stimulent sa formation (BYRNE et coll., 1978). La formation de ce complexe bien défini nécessite de hautes concentrations en NAD (200 μM). Un temps d'incubation prolongé (30 minutes) conduit à une modification encore plus importante de l'histone H1 qui se traduit par une migration beaucoup plus lente en électrophorèse : ceci peut s'expliquer, soit par une augmentation de la taille du poly (ADP-ribose) fixé qui conduirait à une molécule d'histone H1 presque neutre, soit par une augmentation du nombre de sites d'ADP-ribosylation dans la protéine (POIRIER et coll., 1982-a). Cette modification peut engendrer une certaine souplesse de conformation de la chromatine et provoque une condensation localisée et transitoire qui

succède aux structures relâchées que l'on trouve pendant la transcription et la replication (NOLAN et coll.,1980).

La poly (ADP-ribose) polymérase isolée du thymus de Veau modifie légèrement l'histone H5 à de faibles concentrations en NAD. En augmentant la concentration en NAD ou en prolongeant le temps d'incubation, on observe la formation de dimères de H5 et de complexes de taille moléculaire plus élevée. L'affinité de la polymérase est plus faible pour l'histone H5 que pour l'histone H1. Ce résultat est peut-être lié à une différence dans la composition en acides aminés des protéines : en effet, l'histone H5 présente une parenté structurale avec l'histone H1° qui n'est pas ADP-ribosylée dans le foie de Rat (POIRIER et coll.,1978).

Parmi les histones de la "core particle", l'histone H2B est le meilleur substrat pour la poly (ADP-ribose) polymérase, *in vitro*; toutefois, un seul site d'ADP-ribosylation a été localisé dans la protéine au niveau du résidu d'acide glutamique en position 2 (BURZIO et coll.,1979 ; OGATA et coll.,1980-a).

Les autres histones de la "core particle" H2A, H3, la protéine A24 (complexe de l'histone H2A et de l'ubiquitine) (OKAYAMA et HAYAISHI,1978), et certaines protéines HMG (ORD et STOCKEN,1977) sont ADP-ribosylées *in vitro*.

Toutefois, l'identification des accepteurs protéiques de l'ADP-ribose dans des cellules intactes est rendue difficile en raison de l'imperméabilité de la membrane cellulaire au NAD et des faibles quantités de poly (ADP-ribose) endogène.

Très récemment, l'adénosine tritiée a été utilisée pour marquer le NAD et donc le poly (ADP-ribose) dans les cellules intactes. Ainsi, TANUMA et JOHNSON (1983) ont montré que, dans une lignée cellulaire dérivée du carcinome mammaire de Souris, les HMG 1,2,14 et 17 sont modifiées mais seulement 0.03 p.100 des molécules contiennent de l'ADP-ribose. L'ADP-ribosylation des protéines HMG est vraisemblablement liée à l'origine tissulaire de ces protéines : ainsi, dans l'érythrocyte de Poulet, seules les HMG 1 et 2 sont ADP-ribosylées. A concentration élevée en NAD, ces protéines forment des complexes d'ordre supérieur comme cela a été observé pour les histones H1 et H5 (POIRIER et coll.,1982-a). La modification des protéines nucléaires par ADP-ribosylation constitue encore une possibilité pour la cellule de changer la conformation structurale de la chromatine particulièrement au moment de la replication et de la transcription.

II - 4-3 Importance de l'ADP-ribosylation dans la structure de la chromatine

La poly (ADP-ribosylation) des polynucléosomes pancréatiques apporte un relâchement de la structure de la chromatine : les changements de structure, observés en microscopie électronique, montrent que l'ADP-ribosylation, à faible force ionique, transforme la structure en zigzag de la chromatine en structure

en "collier de perles" ; ce relâchement dans la structure de la chromatine est encore plus frappant à force ionique élevée (75 mM NaCl) où les nucléosomes poly (ADP-ribosylés) gardent une structure ouverte tandis que les nucléosomes témoins s'organisent en une fibre de 34 nm (POIRIER et coll.,1982-b). Le mécanisme par lequel la poly (ADP-ribosylation) modifie le rôle de l'histone H1 dans l'organisation des nucléosomes n'est pas connu ; cependant, il est concevable que le poly (ADP-ribose) en diminuant la charge de l'histone affecte sa capacité d'interaction avec le DNA. Par ailleurs, la poly (ADP-ribosylation) d'oligonucléosomes conduit à la formation d'un complexe constitué d'un dimère de H1 lié à 15 ADP-ribose. Ce complexe a été mis en évidence, *in vivo* par des méthodes immunologiques, lors de la transition phase S \longrightarrow phase G2 du cycle cellulaire (WONG et coll.,1983). Ces apparentes contradictions n'excluent pas la possibilité que certains domaines de structure relâchée induite par la poly (ADP-ribosylation) soient présents dans des structures beaucoup plus compactes. (POIRIER et coll.,1982-b). Quoiqu'il en soit, la relaxation de la structure de la chromatine consécutive à l'ADP-ribosylation des protéines est un phénomène ponctuel qui ne semble pas pouvoir être remis en cause ; la conformation plus ouverte qui en découle, expose davantage certaines séquences de DNA soit à la RNA polymérase (l'ADP-ribosylation favorise alors la transcription), soit à la DNA polymérase (l'ADP-ribosylation favorise la replication) (LEVY-WILSON,1983). De ce point de vue, l'ADP-ribosylation des protéines HMG est d'un intérêt particulier puisque ces protéines sont associées aux régions actives de la chromatine (TANUMA et JOHNSON,1983).

Il a été montré également que la biosynthèse de poly (ADP-ribose) est nécessaire à la réparation du DNA : tous les agents qui entraînent des dommages dans la structure du DNA (radiations, agents alkylants.....) provoquent une diminution de la concentration cellulaire en NAD liée à une biosynthèse accrue de poly (ADP-ribose) (WHISH et coll.,1975). Par exemple, un agent alkylant tel que le sulfate de diméthyle stimule l'ADP-ribosylation de l'histone H1. Du fait que tout dommage créé dans la structure du DNA initie les mécanismes de réparation, une relation peut être établie entre la biosynthèse de poly (ADP-ribose), la poly (ADP-ribosylation) des protéines et la réparation du DNA (THI MAN et SHALL,1982). La possibilité de tuer la cellule tumorale en associant des agents alkylants et des inhibiteurs de poly (ADP-ribose) polymérase pourrait être utile dans le traitement de la leucémie (DURKACZ et coll.,1980).

II - 5 UBIQUITINATION

L'ubiquitine ou protéine HMG 20 est une protéine de masse moléculaire 8.451, présente dans les cellules de tous les tissus et de tous les organismes vivants.

Dans la chromatine, 10 p.100 des molécules de H2A sont liés à l'ubiquitine (GOLDKNOPF et BUSCH, 1977) pour former le complexe u-H2A (ou protéine A24) tandis qu'une proportion plus faible de l'histone H2B (1 à 1,5 p.100) se lie à l'ubiquitine pour former u-H2B (WEST et BONNER, 1980).

La protéine u-H2A a une structure branchée : elle est formée par une liaison isopeptidique entre le groupe ϵ -NH₂ de la lysine en position 119 dans l'histone H2A et le groupe α -carboxylique du chaînon glycyglycyl lui-même lié à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine (Figure 14) (GOLDKNOPF et coll., 1977).

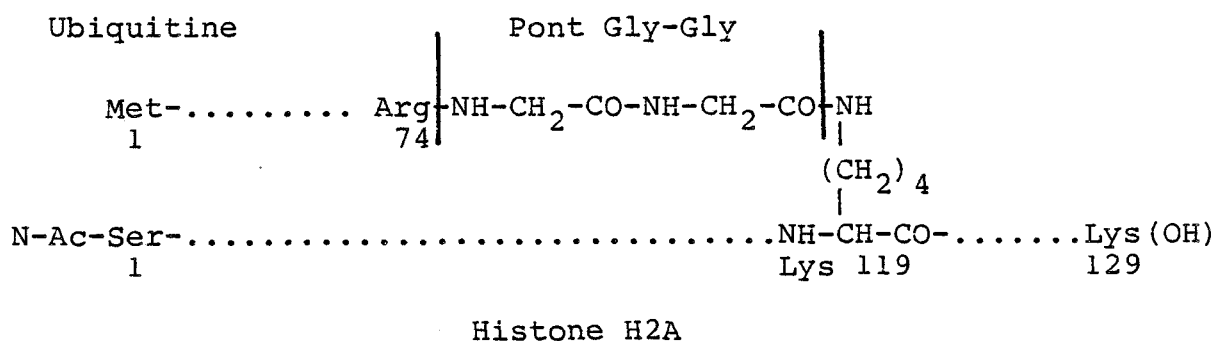


FIGURE 14 STRUCTURE BRANCHEE DE LA PROTEINE A24
(GOLDKNOPF et BUSCH, 1977)

Cette modification affecte de la même façon les quatre variants de l'histone H2A de mammifères (H2A.1, H2A.2, H2A.Y et H2A.Z) (HATCH et coll., 1983); très rapidement après sa synthèse, l'histone H2A se lie à l'ubiquitine (TREMPE et LEFFAK, 1982). Cette liaison nécessite de l'ATP mais l'enzyme nécessaire à la réaction n'est pas encore connu (MATSUMOTO et coll., 1983).

L'ubiquitination ne semble pas avoir d'effet sur les interactions histone-histone puisque les protéines u-H2A et u-H2B sont aussi présentes dans les dimères H2A-H2B (HATCH et coll., 1982). Si la protéine u-H2A est présente dans le nucléosome (GOLDKNOPF et coll., 1977) où elle remplace l'histone H2A, cette modification a peu d'importance sur la structure du nucléosome; cependant, elle peut empêcher la formation de superstructure en modifiant les interactions entre nucléosomes (MATSUI et coll., 1979). D'ailleurs, le déplacement de l'ubiquitine de la protéine u-H2A a lieu lors de la transition interphase → mitose et il paraît essentiel pour l'assemblage des fibres de chromatine dans les spermatocytes. A ce stade de la spermatogénèse, la protéine u-H2A n'est pas détectable ; présente en faible quantité dans les spermatides, elle atteint son maximum à la fin de la spermiogénèse (11 p.100) lorsque la chromatine en se relâchant rend possible la liaison de la protamine aux sites accessibles du DNA avant la condensation finale due au remplacement des histones par les protamines. Ceci conforte l'hypothèse du rôle de u-H2A dans la relaxation de la chromatine (AGELL et coll., 1983).

BIBLIOGRAPHIE DES CHAPITRES I ET II

- ADAMIETZ, P., BREDEHORST, R. and HILZ, H. (1978)
ADP-ribosylated histone H1 from Hela cultures. Fundamental differences to (ADP-ribose)_n - Histone H1 conjugates formed *in vitro*.
Eur.J.Biochem., 91, 317-326.
- ADLER, A.J., LANGAN, T.A. and FASMAN, G.D. (1972)
Complexes of deoxyribonucleic acid with lysine-rich (F1) histone phosphorylated at two separate sites : circular dichroism studies.
Arch.Biochem.Biophys., 153, 769-777.
- AGELL, N., CHIVA, M. and MEZQUITA, C. (1983)
Changes in nuclear content of protein conjugate histone H2A-ubiquitin during rooster spermatogenesis.
FEBS Letters 155, 209-212.
- AJIRO, K., NISHIMOTO, T. and TAKAHASHI, T. (1983)
Histone H1 and H3 phosphorylation during premature chromosome condensation in a temperature - sensitive mutant (ts BN2) of Baby Hamster Kidney cells.
J.Biol.Chem., 258, 4534-4538.
- ALLAN, J., HARTMAN, P.G., CRANE-ROBINSON, C. and AVILES, F.X. (1980)
The structure of histone H1 and its location in chromatin.
Nature 288, 675-679.
- ALLAN, J., COWLING, G.J., HARBORNE, N., CATTINI, P., CRAGIE, R. and GOULD, H. (1981)
Regulation of the higher-order structure of chromatin by histones H1 and H5.
J.Cell Biol., 90, 279-288.
- ALLAN, J., HARBORNE, N., RAU, D.C. and GOULD, H. (1982)
Participation of core histone "Tails" in the stabilization of the chromatin solenoid.
J.Cell Biol., 93, 285-297.

- ALLFREY, V.G., FAULKNER, R.M. and MIRSKY, A.E. (1964)
Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 51, 786-794.
- ALLFREY, V.G. (1982)
Post-synthetic modifications.
in The HMG chromosomal proteins. E.W.JOHNS, ed.
Academic Press, 123-148.
- ALLIS, C.D., GLOVER, C.V.C., BOWEN, J.K. and GOROVSKY, M.A. (1980)
Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular Eucaryote, *Tetrahymena thermophila*.
Cell, 20, 609-617.
- ALLIS, C.D. and GOROVSKY, M.A. (1981)
Histone phosphorylation in macro- and micronuclei of *Tetrahymena thermophila*.
Biochemistry, 20, 3828-3833.
- BAER, B.W. and RHODES, D. (1983)
Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes.
Nature, 301, 482-488.
- BAKAYEV, V.V., BAKAYEVA, T.G., SCHMATCHENKO, V.V. and GEORGIEV, G.P. (1978)
Non-histone proteins in mononucleosomes and subnucleosomes.
Eur.J.Biochem., 91, 291-301.
- BALHORN, R., BALHORN, M., MORRIS, H.P. and CHALKLEY, R. (1972)
Comparative high-resolution electrophoresis of tumor histones: variation in phosphorylation as a function of cell replication rate.
Cancer Res., 32, 1775-1784.
- BEHE, M. and FELSENFELD, G. (1981)
Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly (dG - m⁵dC). poly (dG - m⁵dC).
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78, 1619-1623.
- BENEZRA, R., BLANKSTEIN, L.A., STOLLAR, B.D. and LEVY, S.B. (1981)
Immunological and organizational heterogeneity of histone H2A variants within chromatin of cells at different stages of Friend Leukemia.
J.Biol.Chem., 256, 6837-6841.
- BEREZNEY, R. and BUCHHOLTZ, L.A. (1981)
Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver.
Exp.Cell.Res., 132, 1-13.

- BLANKSTEIN, L.A., STOLLAR, B.D., FRANKLIN, S.G., ZWEIDLER, A. and LEVY, S.B. (1977)
Biochemical and immunological characterization of two distinct variants of histone H2A in Friend Leukemia.
Biochemistry, 16, 4557-4562.
- BODE, J. HENCO, K. and WINGENDER, E. (1980)
Modulation of the nucleosome structure by histone acetylation.
Eur.J.Biochem., 110, 143-152.
- BODE, J., GOMEZ-LIRA, M.M. and SCHRÖTER, H. (1983)
Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated.
Eur.J.Biochem., 130, 437-445.
- BOFFA, L.C., STERNER, R., VIDALI, G. and ALLFREY, V.G. (1979)
Post-synthetic modifications of nuclear proteins. High mobility group proteins are methylated.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 89, 1322-1327.
- BÖHM, J., SCHLAEGER, E.J. and KNIPPERS, R. (1980)
Acetylation of nucleosomal histones *in vitro*.
Eur.J.Biochem., 112, 353-362.
- BÖHM, L., HAYASHI, H., CARY, P.D., MOSS, T., CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1977)
Sites of histone/histone interactions in the H3:H4 complex.
Eur.J.Biochem., 77, 487-493.
- BÖHM, L., CRANE-ROBINSON, C. and SAUTIERE, P. (1980)
Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of a limit peptide of histone H2A.
Eur.J.Biochem., 106, 525-530.
- BÖHM, L., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and CRANE-ROBINSON, C. (1981)
Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of the limit peptides of histones H3 and H4.
Eur.J.Biochem., 119, 67-74.
- BÖHM, L., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and CRANE-ROBINSON, C. (1982)
Proteolytic digestion studies of chromatin core-histone structure. Identification of limit peptides from histone H2B.
Eur.J.Biochem., 123, 299-303.
- BONNE, C., SAUTIERE, P., DUGUET, M. and DE RECONDO, A.M. (1982)
Identification of a single-stranded DNA binding protein from Rat liver with high mobility group protein I.
J.Biol.Chem., 257, 2722-2725.

- BOULIKAS, T., WISEMAN, J.M. and GARRARD, W.T. (1980)
Points of contact between histone H1 and the histone octamer.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77, 127-131.
- BRADBURY, E.M., CARPENTER, B.G. and RATTLE, H.W.E. (1973-a)
Magnetic resonance studies of deoxyribonucleoprotein chromatin H1 condensation.
Nature, 241, 123-126.
- BRADBURY, E.M., INGLIS, R.J., MATTHEWS, H.R. and SARNER, N. (1973-b)
Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum* : correlation with chromosome condensation.
Eur.J.Biochem., 33, 131-139.
- BRADBURY, E.M., INGLIS, R.J. and MATTHEWS, H.R. (1974)
Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes.
Nature, 247, 257-261.
- BRADBURY, E.M., MOSS, T., HAYASHI, H., HJELM, P., SUAU, P., STEPHENS, R.M., BALDWIN, J.P. and CRANE-ROBINSON, C. (1978)
Nucleosomes, histone interactions and the role of histones H3 and H4.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 42, 277-286.
- BRAUTIGAN, D.L., BORNSTEIN, P. and GALLIS, B. (1981)
Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn^{2+} .
J.Biol.Chem., 256, 6519-6522.
- BREDEHORST, R., WIELCKENS, K., GARTEMANN, A., LENGYEL, H., KLAPPROTH, K. and HILZ, H. (1978)
Two different types of bonds linking single ADP-ribose residues covalently to proteins. Quantification in eukaryotic cells.
Eur.J.Biochem., 92, 129-135.
- BROTHERTON, T.W., COVAULT, J., SHIRES, A. and CHALKLEY, R. (1981)
Only a small fraction of avian erythrocyte histone is involved in ongoing acetylation.
Nucleic Acids Research, 9, 5061-5073.
- BURZIO, L.O., RIQUELME, P.T. and KOIDE, S.S. (1979)
ADP-ribosylation of rat liver nucleosomal core histones
J.Biol.Chem., 254, 3029-3037.
- BYRNE, R.H., STONE, P.R. and KIDWELL, W.R. (1978)
Effect of polyamines and divalent cations on histone H1-poly (adenosine diphosphate ribose) complex formation.
Exp.Cell.Res., 115, 277-283.

- BYVOET, P. (1971)
Uptake of label into methylated amino acids from rat tissue histones after *in vivo* administration of (Me-¹⁴C) methionine.
Biochim. Biophys. Acta, 238, 375-376.
- BYVOET, P. and BAXTER, C.S. (1975)
Histone methylation, a functional enigma.
in "Chromosomal proteins and their role in the regulation of gene expression" by STEIN, G.S. and KLEINSMITH, L.J., Academic Press, N.Y. 127-151.
- CANDIDO, E.P.M., REEVES, R. and DAVIE, J.R. (1978)
Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells.
Cell, 14, 105-113.
- CARY, P.D., MOSS, T. and BRADBURY, E.M. (1979)
High resolution proton magnetic resonance studies of chromatin core particles.
Eur. J. Biochem., 89, 475-482.
- CASTILLON, M.P., CATALAN, R.E. and MUNICIO, A.M. (1973)
Adenyl cyclase variation during development of the insect, *Ceratitidis capitata*.
FEBS Letters, 32, 133.
- CATALAN, R.E. and MUNICIO, A.M. (1974)
Protein kinase activity during the development of the insect *Ceratitidis capitata*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 1394-1399.
- CHAHAL, S.S., MATTHEWS, H.R. and BRADBURY, E.M. (1980)
Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function.
Nature, 287, 76-79.
- CHAMBERS, T.C., LANGAN, T.A., MATTHEWS, H.R. and BRADBURY, E.M. (1983)
H1 histone kinases from nuclei of *Physarum polycephalum*.
Biochemistry, 22, 30-37.
- CHEN, C.C., SMITH, D.L., BRUEGGER, B.B., HALPERN, R.M. and SMITH, R.A. (1974)
Occurrence and distribution of acid-labile histone phosphates in regenerating rat liver.
Biochemistry, 13, 3785-3789.
- CHEN, C.C., BRUEGGER, B.B., KERN, C.W., LIN, Y.C., HALPERN, R.M. and SMITH, R.A. (1977)
Phosphorylation of nuclear proteins in rat regenerating liver.
Biochemistry, 16, 4852-4855.

- CHRISTENSEN, M.E. and DIXON, G.H. (1982)
Hyperacetylation of histone H4 correlates with the terminal, transcriptionally inactive stages of spermatogenesis in rainbow trout.
Dev. Biol., 93, 404-415.
- CLEMENS, M. (1983)
Protein phosphorylation and translation of messenger RNAs.
Nature, 302, 110
- COHEN, L.H., NEWROCK, K.M. and ZWEIDLER, A. (1975)
Stage-specific switches in histone synthesis during embryogenesis of the sea urchin.
Science, 190, 994-997.
- COHEN, S., CARPENTER, G. and KING, L. Jr (1980)
Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity.
J. Biol. Chem., 255, 4834-4842.
- COMPTON, J.L., BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1976)
Biochemical evidence of variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4382-4386.
- COOPER, J.A., REISS, N.A., SCHWARTZ, R.J. and HUNTER, T. (1983)
Three glycolytic enzymes are phosphorylated at tyrosine in cells transformed by Rous sarcoma virus.
Nature, 302, 218-223.
- COUSENS, L.S., GALLWITZ, D. and ALBERTS, B.M. (1979)
Different accessibilities in chromatin to histone acetylase.
J. Biol. Chem., 254, 1716-1723.
- COVAULT, J. and CHALKLEY, R. (1980)
Identification of distinct populations of acetylated histone.
J. Biol. Chem., 255, 9110-9116.
- COVAULT, J., SEALY, L., SCHNELL, R., SHIRES, A. and CHALKLEY, R. (1982)
Histone hypoacetylation following release of HTC cells from butyrate.
J. Biol. Chem., 257, 5809-5815.
- D'ANNA, J.A. and ISENBERG, I. (1974)
A histone cross-complexing pattern.
Biochemistry, 13, 4992-4997.

- D'ANNA, J.A., TOBEY, R.A. and GURLEY, L.R. (1980)
Concentration-dependent effects of sodium butyrate in Chinese Hamster cells : cell-cycle progression, inner-histone acetylation, histone H1 dephosphorylation and induction of an H1-like protein.
Biochemistry, 19, 2656-2671.
- DASGUPTA, J.D. and GARBERS, D.L. (1983)
Tyrosine protein kinase activity during embryogenesis.
J.Biol.Chem., 258, 6174-6178.
- DE LA HOUSSAYE, B.A., ECHOLS, T.K. and MASARACCHIA, R.A. (1983)
Activation of a cyclic AMP-independent protein kinase by an endogenous ATP-requiring protease from lymphosarcoma cells.
J.Biol.Chem., 258, 4272-4278.
- DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L. and BONNER, J. (1969)
Calf and pea histone IV. III Complete amino acid sequence of pea seedling histone. Comparison with the homologous calf thymus histone.
J.Biol.Chem., 244, 5669-5679.
- DE LANGE, R.J., HOOPER, J.A. and SMITH, E.L. (1973)
Histone III. III - Sequence studies on the cyanogen bromide peptides ; complete amino acid sequence of calf thymus histone III.
J.Biol.Chem., 248, 3261-3274.
- DIXON, G.H., CANDIDO, E.P.M., HONDA, B.M., LOUIE, A.J., MACLEOD, A.R. and SUNG, M.T. (1975)
The biological roles of post-synthetic modifications of basic nuclear proteins.
Ciba Found.Symp., 28, 229-258.
- DOENECKE, D. and GALLWITZ, D. (1982)
Acetylation of histones in nucleosomes.
Mol.Cell.Biochem., 44, 113-128.
- DUNCAN, M.R., ROBINSON, M.J. and DELL'ORCO, R.T. (1983)
Kinetics of histone hyperacetylation and deacetylation in human diploid fibroblasts.
Biochim.Biophys.Acta, 762, 221-226.
- DURKACZ, B.W., OMIDIJI, O., GRAY, D.A. and SHALL, S. (1980)
(ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair.
Nature, 283, 593-596.
- EICKBUSH, T.E. and MOUDRIANAKIS, E.M. (1978)
The histone core complex : an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.
Biochemistry, 17, 4955-4964.

- EK, B., WESTERMARK, B., WASTESON, A. and HELDIN, C.H. (1982)
Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by
platelet-derived growth factor.
Nature, 295, 419-420.
- ERARD, M., POUYET, J., MAZEN, A., CHAMPAGNE, M. and DAUNE, M. (1981)
Core particle stability critically depends upon a small
number of terminal nucleotides.
Biophysical Chemistry, 14, 123-133.
- FINCH, J.T. and KLUG, A. (1976)
Solenoidal model for superstructure in chromatin.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 73, 1897-1901.
- FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUSHTON, B.,
LEVITT, M. and KLUG, A. (1977)
Structure of nucleosome core particles of chromatin.
Nature, 269, 29-36.
- FLINT, S.J. and WEINTRAUB, H. (1977)
An altered subunit configuration associated with the
actively transcribed DNA of integrated adenovirus genes.
Cell, 12, 783-792.
- FOULKES, J.D., ERIKSON, E. and ERIKSON, R.L. (1983)
Separation of multiple phosphotyrosyl- and phosphoseryl-
protein phosphatases from chicken brain.
J.Biol.Chem., 258, 431-438.
- FRANKLIN, S.F. and ZWEIDLER, A. (1977)
Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals.
Nature, 266, 273-275.
- GARCEA, R.L. and ALBERTS, B. (1980)
Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes,
nuclei and intact cells.
J.Biol.Chem., 255, 11454-11463.
- GAREL, A. and AXEL, R.R. (1976)
Selective digestion of transcriptionally active ovalbu-
min genes from oviduct nuclei.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 73, 3966-3970.
- GAREL, A., ZOLAN, M. and AXEL, R. (1977)
Genes transcribed at diverse rates have a similar confor-
mation in chromatin.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 4867-4871.
- GEORGIEVA, E.I., PASHEV, I.G. and TSANEV, R.G. (1981)
Distribution of high mobility group and other acid-solu-
ble proteins in fractionated chromatin.
Biochim.Biophys.Acta, 652, 240-244.

- GIRI, C.P., WEST, M.H.P., RAMIREZ, M.L. and SMULSON, M. (1978)
Nuclear protein modification and chromatin substructure.
2. Internucleosomal localization of poly (adenosine di-
phosphate-ribose) polymerase.
Biochemistry, 17, 3501-3504.
- GLASS, D.B. and KREBS, E.G. (1979)
Comparison of the substrate specificity of adenosine 3':
5'-monophosphate- and guanosine 3': 5'-monophosphate-
dependent protein kinases. Kinetic studies using synthe-
tic peptides corresponding to phosphorylation sites in
histone H2B.
J.Biol.Chem., 254, 9728-9738.
- GOLDKNOPF, I.L. and BUSCH, H. (1977)
Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A
polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 864-868.
- GOLDKNOPF, I.L., FRENCH, M.F., MUSSO, R. and BUSCH, H. (1977)
Presence of protein A24 in rat liver nucleosomes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 5492-5495.
- GOROVSKY, M.A., GLOVER, C., JOHMANN, C.A., KEEVERT, J.B.,
MATHIS, D.J. and SAMUELSON, M. (1977)
Histones and chromatin structure in *Tetrahymena* macro-
and micronuclei.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 42, 493-503.
- GOTTESFELD, J.M. and BUTLER, D.J.G. (1977)
Structure of transcriptionally-active chromatin subunits.
Nucleic Acids Research, 9, 3155-3173.
- GROUDINE, M., DAS, S., NIEMAN, P. and WEINTRAUB, H. (1978)
Regulation of expression and chromosomal subunit confor-
mation of avian retrovirus genomes.
Cell, 14, 865-878.
- GURLEY, L.R., WALTERS, R.A. and TOBEY, R.A. (1974)
Cell cycle-specific changes in histone phosphorylation
associated with cell proliferation and chromosome con-
densation.
J.Cell.Biol., 60, 356-364.
- GURLEY, L.R., WALTERS, R.A. and TOBEY, R.A. (1975)
Sequential phosphorylation of histone subfractions in
the Chinese Hamster cell cycle.
J.Biol.Chem., 250, 3936-3944.
- GURLEY, L.R., WALTERS, R.A., BARHAM, S.S. and DEAVEN, L.L. (1978-a)
Heterochromatin and histone phosphorylation.
Exp.Cell.Res., 111, 373-383.

- GURLEY, L.R., D'ANNA, J.A., BARHAM, S.S., DEAVEN, L.L. and TOBEY, R.A. (1978-b)
Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese Hamster cells.
Eur.J.Biochem., 84, 1-15.
- HALLECK, M.S. and GURLEY, L.R. (1981)
Histone acetylation and heterochromatin content of cultured *Peromyscus* cells.
Exp.Cell Res., 132, 201-213.
- HARRIS, M.R., HARBORNE, N., SMITH, B.J. and ALLAN, J. (1982)
The distribution of the histone H1^o in different brain cell types.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 109, 78-82.
- HARRISON, J.J. and JUNGMANN, R.A. (1982)
Phosphorylation of high mobility group proteins 14 and 17 by nuclear protein kinase NII in rat C6 glioma cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 108, 1204-1209.
- HASHIMOTO, E., TAKEDA, M. and NISHIZUKA, Y. (1975)
Phosphorylated sites of calf thymus histone H2B by adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase from silkworm.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 66, 547-555.
- HATCH, C.L., BONNER, W.M. and MOUDRIANAKIS, E.N. (1983)
Minor H2A variants and ubiquitinated forms in the native H2A : H2B dimer.
Science, 221, 468-470.
- HAYAISHI, O. (1976)
Poly ADP-ribose and ADP-ribosylation of proteins.
Trends Biochem.Sci., 1, 9-10.
- HAYAISHI, O. and UEDA, K. (1977)
Poly (ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins.
Ann.Rev.Biochem., 46, 95-116.
- HELENE, C. (1981)
Recognition of base sequences by regulatory proteins in procaryotes and eucaryotes.
Bioscience Reports, 1, 477-483.
- HENRY, S.M. and HODGE, L.D. (1983)
Nuclear matrix : a cell-cycle-dependent site of increased intranuclear protein phosphorylation.
Eur.J.Biochem., 133, 23-29.



- HEWISH, D.R. and BURGOYNE, L.A. (1973)
Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regular spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. Biochem.Biophys.Res.Comm., 52, 504-510.
- HOHMANN, P. (1978)
The H1 class of histone and diversity in chromatin structure. Subcell.Biochem., 5, 87-127.
- HONJO, T., NISHIZUKA, Y., HAYASHI, O. and KATO, I. (1968)
Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. J.Biol.Chem., 243, 3553-3555.
- HÖRLEIN, D., GALLIS, B., BRAUTIGAN, D.L. and BORNSTEIN, P. (1982)
Partial purification and characterization of phosphotyrosyl-protein phosphatase from Ehrlich ascites tumor cells. Biochemistry, 21, 5577-5584.
- HUNT, B.F. and VOGELSTEIN, B. (1981)
Association of newly replicated DNA with the nuclear matrix of *Physarum polycephalum*. Nucleic Acids Research, 9, 349-363.
- HUNTER, T. and SEFTON, B.M. (1980)
Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77, 1311-1315.
- HUNTER, T. (1982)
Phosphotyrosine - a new protein modification. Trends Biochem.Sci., 7, 246-249.
- INGLIS, R.J., LANGAN, T.A., MATTHEWS, H.R., HARDIE, D.G. and BRADBURY, E.M. (1976)
Advance of mitosis by histone phosphokinase. Exp.Cell Res., 97, 418-425.
- ISACKSON, P.J. and REECK, G.R. (1981)
Nonhistone chromatin proteins HMG-14 and HMG-17 bind preferentially to single-stranded DNA. Nucleic Acids Research, 9, 3779-3791.
- ISHIMI, Y., OHBA, Y., YASUDA, H. and YAMADA, M. (1981)
The interaction of H1 histone with nucleosome core. J.Biochem., 89, 1881-1888.
- IWASA, Y., TAKAI, Y., KIKKAWA, U. and NISHIZUKA, Y. (1980)
Phosphorylation of calf thymus H1 histone by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Biochem.Biophys.Res.Comm., 96, 180-187.

- JACKSON, J.B., POLLOCK, J.M. Jr and RILL, R.L. (1979)
Chromatin fractionation procedure that yields nucleosomes containing near-stoichiometric amounts of high mobility group nonhistone chromosomal proteins.
Biochemistry, 18, 3739-3748.
- JACKSON, D.A., McCREADY, S.J. and COOK, P.R. (1981)
RNA is synthesized at the nuclear cage.
Nature, 292, 552-555.
- JAVAHERIAN, K., SADEGHI, M. and LIU, L.F. (1979)
Nonhistone proteins HMG 1 and HMG 2 unwind DNA double helix.
Nucleic Acids Research, 6, 3569-3580.
- JERZMANOWSKI, A. and STARON, K. (1981)
Can phosphorylation of histone H1 be responsible for chromatin condensation in mitosis.
J.Theor.Biol., 89, 191-194.
- JOHNS, E.W., GOODWIN, G.H., WALKER, J.M. and SANDERS, C. (1975)
Chromosomal proteins related to histones.
Struc.Funct.Chromatin, Symp. 1974, 95-112.
- JUNGMANN, R.A. and KRANIAS, E.G. (1977)
Nuclear phosphoprotein kinases and the regulation of gene transcription.
Int.J.Biochem., 8, 819-830.
- KASUGA, M., ZICK, Y., BLITHE, D.L., CRETZAZ, M. and KAHN, C.R. (1982)
Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell-free system.
Nature, 298, 667-669.
- KASUGA, M., FUJITA-YAMAGUCHI, Y., BLITHE, D.L. and KAHN, C.R. (1983)
Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 2137-2141.
- KELLEY, R.I. (1973)
Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 54, 1588-1594.
- KIRYANOV, G.I., SMIRNOVA, T.A. and POLYAKOV, V.YU (1982)
Nucleomeric organization of chromatin.
Eur.J.Biochem., 124, 331-338.
- KLUG, A., RHODES, D., SMITH, J., FINCH, J.T. and THOMAS, J.O. (1980)
A low resolution structure for the histone core of the nucleosome.
Nature, 287, 509-516.

- KOLODRUBETZ, D., RYKOWSKI, M.C. and GRUNSTEIN, M. (1982)
Histone H2A subtypes associate interchangeably *in vivo*
with histone H2B subtypes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 7814-7818.
- KORNBERG, R.D. (1974)
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.
- KORNBERG, R.D. and THOMAS, J.O. (1974)
Chromatin structure : oligomers of the histones.
Science, 184, 865-868.
- KRYSTAL, G.W. and POCCIA, D.L. (1981)
Phosphorylation of cleavage stage histone H1 in mitotic
and prematurely condensed chromosomes.
Exp.Cell Res., 134, 41-48.
- KUO, J.F. and GREENGARD, P. (1970)
Cyclic nucleotide dependent protein kinases. VI. Isola-
tion and partial purification of protein kinase activa-
ted by guanosine 3',5' monophosphate.
J.Biol.Chem., 245, 2493-2498.
- KURODA, Y., HASHIMOTO, E. and NISHIZUKA, Y. (1976)
Phosphorylated sites of calf thymus H2B histone by ade-
nosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from
bovine cerebellum.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 71, 629-635.
- LAKE, R.S. and SALZMAN, N.P. (1972)
Occurrence and properties of a chromatin-associated F1-
histone phosphokinase in mitotic Chinese Hamster cell.
Biochemistry, 11, 4817-4826.
- LAKE, R.S. (1973)
Further characterization of the F1 histone phosphokinase
of metaphase-arrested animal cells.
J.Cell.Biol., 58, 317-331.
- LANGAN, T.A. (1969)
Phosphorylation of liver histone following the adminis-
tration of glucagon and insulin.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 64, 1276-1283.
- LANGAN, T.A. (1978)
Isolation of histone kinases.
Methods Cell Biol., 19, 143-152.

- LANGAN, T.A. (1982)
Characterization of highly phosphorylated subcomponents
of rat thymus H1 histone.
J.Biol.Chem., 257, 14835-14846.
- LASKEY, R.A. and EARNSHAW, W.C. (1980)
Nucleosome assembly.
Nature, 286, 763-767.
- LEE, H.W., PAIK, W.K. and BORUN, T.W. (1973)
The periodic synthesis of S-adenosylmethionine : protein
methyltransferases during the HeLa S-3 cell cycle.
J.Biol.Chem., 248, 4194-4199.
- LEVINGER, L. and VARSHAVSKY, A. (1982)
Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-
containing nucleosomes within the Drosophila genome.
Cell, 28, 375-385.
- LEVY, B.W. and DIXON, G.H. (1978)
Partial purification of transcriptionally active nucleo-
somes from trout testis cells.
Nucleic Acids Research, 5, 4155-4163.
- LEVY-WILSON, B., CONNOR, W. and DIXON, G. (1979)
A subset of trout testis nucleosomes enriched in trans-
cribed DNA sequences contains high mobility group pro-
teins as major structural components.
J.Biol.Chem., 254, 609-620.
- LEVY-WILSON, B. (1983)
Glycosylation, ADP-ribosylation and methylation of
Tetrahymena histones.
Biochemistry, 22, 484-489.
- LEVY-WILSON, B., DENKER, M.S. and ITO, E. (1983)
Isolation, characterization and postsynthetic modifica-
tions of *Tetrahymena* high mobility group proteins.
Biochemistry, 22, 1715-1721.
- LIBBY, P.R. (1978)
Calf liver nuclear N-acetyltransferases.
J.Biol.Chem., 253, 233-237.
- LIBERATI-LANGENBUCH, J., WILHELM, M.L., GIGOT, C. and WILHELM, F.X.
(1980)
Plant and animal histones are completely interchangeable
in the nucleosome core.
Biochem.Biophys.Res.Commun., 94, 1161-1168.
- LOIDL, P., LOIDL, A., PUSCHENDORF, B. and GRÖBNER, P. (1983)
Lack of correlation between histone H4 acetylation and
transcription during the *Physarum* cell cycle.
Nature, 305, 446-448.

- LOUIS, C., SCHEDL, P., SAMAL, B. and WORCEL, A. (1980)
Chromatin structure of the 5S RNA genes of *D. melanogaster*.
Cell, 22, 387-392.
- MAJUMDER, G.C. (1978)
Characterization of a protein kinase from human seminal plasma.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 1217-1226.
- MANAI, M. and COZZONE, A.J. (1979)
Analysis of the protein-kinase activity of *Escherichia coli* cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, 819-826.
- MANGÉAT, P.H., CHAHINIAN, H. and MARCHIS-MOUREN, G.J. (1978)
Characterization of the cyclic AMP-dependent protein kinase from rat pancreas, further purification of the catalytic subunit, substrate specificity, effect of the pancreatic heat stable inhibitor.
Biochimie, 60, 777-785.
- MARDIAN, J.K.W., PATON, A.E., BUNICK, G.J. and OLINS, D.E. (1980)
Nucleosome cores have two specific binding sites for non-histone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17.
Science, 209, 1534-1536.
- MAREKOV, L.N. and BELTCHEV, B.G. (1982)
Influence of high-mobility-group nonhistone Chromosomal proteins 1 and 2 on the digestion of chromatin with micrococcal nuclease.
Arch. Biochem. Biophys., 219, 261-267.
- MARKS, D.B., PAIK, W.K. and BORUN, T.W. (1973)
The relationship of histone phosphorylation to deoxyribonucleic acid replication and mitosis during the HeLa S-3 cell cycle.
J. Biol. Chem., 248, 5560-5567.
- MARTINAGE, A., QUIRIN-STRICKER, C., CHAMPAGNE, M. and SAUTIERE, P. (1981)
Phosphorylated sites of chicken erythrocyte histone H5 by a cyclic AMP-independent protein kinase from mouse plasmocytoma cells.
FEBS Letters, 134, 103-106.
- MARTINSON, H.G. and Mc CARTHY, B.J. (1976)
Histone-histone interactions within chromatin. Preliminary characterization of presumptive H2B-H2A and H2B-H4 binding sites.
Biochemistry, 15, 4126-4131.

- MARTINSON, H.G., TRUE, R., LAU, C.K. and MEHRABIAN, M. (1979)
Histone-histone interactions within chromatin. Preliminary location of multiple contact sites between histones 2A, 2B and 4.
Biochemistry, 18, 1075-1082.
- MARUSHIGE, Y. and MARUSHIGE, K. (1978)
Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals.
Biochim. Biophys. Acta, 518, 440-449.
- MATHIS, D.J., OUDET, P., WASYLYK, B. and CHAMBON, P. (1978)
Effect of histone acetylation on structure and *in vitro* transcription of chromatin.
Nucleic Acids Research, 5, 3523-3547.
- MATSUI, S., SEON, B.K. and SANDBERG, A.A. (1979)
Disappearance of a structural chromatin protein A24 in mitosis : implications for molecular basis of chromatin condensation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6386-6390.
- MATSUMOTO, Y., YASUDA, H., MITA, S., MARUNOUCHI, T. and YAMADA, M. (1980)
Evidence for the involvement of H1 histone phosphorylation in chromosome condensation.
Nature, 284, 181-183.
- MATSUMOTO, Y., YASUDA, H., MARUNOUCHI, T. and YAMADA, M. (1983)
Decrease in uH2A (protein A24) of a mouse temperature-sensitive mutant.
FEBS Letters, 151, 139-142.
- MCGHEE, J.D. and FELSENFELD, G. (1980)
The number of charge-charge interactions stabilizing the ends of nucleosome DNA.
Nucleic Acids Research, 8, 2751-2769.
- MCGHEE, J.D., RAU, D.C., CHARNEY, E. and FELSENFELD, G. (1980)
Orientation of the nucleosome within the higher order structure of chromatin.
Cell, 22, 87-96.
- MITCHELSON, K., CHAMBERS, T., BRADBURY, E.M. and MATTHEWS, H.R. (1978)
Activation of histone kinase in G2 phase of the cell cycle in *Physarum polycephalum*.
FEBS Letters, 92, 339-342.
- MORRIS, R. (1976)
Nucleosome structure in *Aspergillus nidulans*.
Cell, 8, 357-363.

- MOSS, T., CARY, P.D., ABERCROMBIE, B.D., CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1976)
A pH dependent interaction between histones H2A and H2B involving secondary and tertiary folding.
Eur.J.Biochem., 71, 337-350.
- MOSS, J. and STANLEY, S.J. (1981)
Amino acid-specific ADP-ribosylation. Identification of an arginine-dependent ADP-ribosyltransferase in rat liver.
J.Biol.Chem., 256, 7830-7833.
- MULLER, S., ERARD, M., BURGGRAF, E., COUPPEZ, M., SAUTIERE, P., CHAMPAGNE, M. and VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1982)
Immunochemical detection of changes in chromatin subunits induced by histone H4 acetylation.
Embo J., 1, 939-944.
- MURRAY, K. (1964)
The occurrence of ϵ -N-methyllysine in histones.
Biochemistry, 3, 10-15.
- NEHARA, H., TAKAHASHI, T. and OGATA, K. (1966)
Acetylation of histones by pigeon liver enzymes.
Biochim.Biophys.Acta, 127, 282-284.
- NELSON, D., PERRY, M. and CHALKLEY, R. (1979)
A correlation between nucleosome spacer region susceptibility to DNase I and histone acetylation.
Nucleic Acids Research, 6, 561-574.
- NEWROCK, K.M., ALFAGEME, C.R., NARDI, R.V. and COHEN, L.H. (1978)
Histone changes during chromatin remodeling in embryogenesis.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 42, 421-431.
- NOLAN, N.L., BUTT, T.R., WONG, M., LAMBRIANIDOU, A. 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.
- NOLL, M. and KORNBERG, R.D. (1977)
Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1.
J.Mol.Biol., 109, 393-404.
- OGATA, N., UEDA, K. and HAYAISHI, O. (1980-a)
ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the modification site.
J.Biol.Chem., 255, 7610-7615.

- OGATA, N., UEDA, K., KAGAMIYAMA, H. and HAYAISHI, O. (1980-b)
ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic residues 2,14 and the COOH-terminal lysine residue as modification sites.
J.Biol.Chem., 255, 7616-7620.
- OGAWA, Y., QUAGLIAROTTI, G., JORDAN, J., TAYLOR, C.W., STARBUCK, W.C. and BUSCH, H. (1969)
Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone. III. Sequence of the amino-terminal half of the molecule containing the modified lysine residues and the total sequence.
J.Biol.Chem., 244, 4387-4392.
- OKAYAMA, H. and HAYAISHI, O. (1978)
ADP-ribosylation of nuclear protein A24.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 84, 755-762.
- OLINS, A.L. and OLINS, D.E. (1974)
Spheroid chromatin units (ν bodies).
Science, 183, 330-332.
- OLIVA, R. and MEZQUITA, C. (1982)
Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids.
Nucleic Acids Research, 10, 8049-8059.
- ORD, M.G. and STOCKEN, L.A. (1967)
Changes in the phosphorylation of histones during liver regeneration.
Biochem.J., 103, 5-6P.
- ORD, M.G. and STOCKEN, L.A. (1977)
Adenosine diphosphate ribosylated histones.
Biochem.J., 161, 583-592.
- OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1974)
Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit.
Cell, 4, 281-300.
- PAIK, W.K. and KIM, S. (1971)
Protein methylation. Enzymatic methylation of proteins after translation may take part in control of biological activities of proteins.
Science, 174, 114-119.
- PAIK, W.K. and KIM, S. (1980)
Protein methylation.
Published by John WILEY and Sons, N.Y.

- PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969)
A new histone found only in mammalian tissues with
little cell division.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 1042-1049.
- PARDON, J.F., WORCESTER, D.L., WOOLEY, J.C., TATCHALL, K.,
VAN HOLDE, K.E. and RICHARDS, B.M. (1975)
Low angle neutron scattering from chromatin subunit
particles.
Nucleic Acids Research, 2, 2163-2176.
- PASHEV, I.G., DIMITROV, S.I., IVANOV, I.G. and MARKOV, G.G. (1983)
Histone acetylation in chromatin containing mouse satel-
lite DNA.
Eur. J. Biochem., 133, 379-382.
- PAULSON, J.R. and LAEMMLI, U.K. (1977)
The structure of histone-depleted metaphase chromosomes.
Cell, 12, 817-825.
- PAULSON, J.R. and LANGMORE, J.P. (1983)
Low angle X-ray diffraction studies of HeLa metaphase
chromosomes : effects of histone phosphorylation and
chromosome isolation procedure.
J. Cell Biol., 96, 1132-1137.
- PERRY, M. and CHALKLEY, R. (1982)
Histone acetylation increases the solubility of chroma-
tin and occurs sequentially over most of the chromatin.
A novel model for the biological role of histone acety-
lation.
J. Biol. Chem., 257, 7336-7347.
- PETRUZELLI, L.M., GANGULY, S., SMITH, C.J., COBB, M.H., RUBIN, C.S.
and ROSEN, O.M. (1982)
Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in
extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6792-6796.
- PHILLIPPS, D.M.P. (1963)
The presence of acetyl groups in histones.
Biochem. J., 87, 258-263.
- POIRIER, G.G., SAVARD, P., RAJOTTE, D., MORISSET, J. and LORD, A.
(1978)
Properties of poly (ADP-ribose) synthetase from rat pan-
creas and poly (ADP-ribosylation) of basic nuclear pro-
teins.
Can. J. Biochem., 56, 784-790.
- POIRIER, G.G. and SAVARD, P. (1980)
ADP-ribosylation of pancreatic histone H1 and of other
histones.
Can. J. Biochem., 58, 509-515.

- POIRIER, G.G., NIEDERGANG, C., CHAMPAGNE, M., MAZEN, A. and MANDEL, P. (1982-a)
Adenosine diphosphate ribosylation of chicken-erythrocyte histones H1, H5 and high-mobility-group proteins by purified calf thymus poly (adenosinediphosphate-ribose) polymerase.
Eur.J.Biochem., 127, 437-442.
- POIRIER, G.G., DE MURCIA, G., JONGSTRA-BILEN, J., NIEDERGANG, C. and MANDEL, P. (1982-b)
Poly (ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 79, 3423-3427.
- QUIRIN-STRICKER, C. and SCHMITT, M. (1981)
Purification and characterization of a specific histone H1 protein kinase from mouse plasmacytoma.
Eur.J.Biochem., 118, 165-172.
- REECK, G.R., ISACKSON, P.J. and TELLER, D.C. (1982)
Domain structure in high molecular weight high mobility group nonhistone chromatin proteins.
Nature, 300, 76-78.
- REEVES, R. and CANDIDO, E.P.M. (1980)
Partial inhibition of histone deacetylase in active chromatin by HMG 14 and HMG 17.
Nucleic Acids Research, 8, 1947-1963.
- REEVES, R. and CHANG, D. (1983)
Investigations of the possible functions for glycosylation in the high mobility group proteins. Evidence for a role in nuclear matrix association.
J.Biol.Chem., 258, 679-687.
- RENZ, M., NEHLS, P. and HOZIER, J. (1977)
Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 1879-1883.
- RIGGS, M.G., WHITTAKER, R.G., NEUMANN, J.R. and INGRAM, V.M. (1977)
n-butyrate causes histone modification in Hela and Friend erythroleukaemia cells.
Nature, 268, 462-464.
- RING, P. and COLE, R.D. (1979)
Chemical crosslinking of H1 histone to the nucleosomal histones.
J.Biol.Chem., 254, 11688-11695.
- RIQUELME, P.T., BURZIO, L.O. and KOIDE, S.S. (1979)
ADP ribosylation of rat liver lysine-rich histone *in vitro*.
J.Biol.Chem., 254, 3018-3028.

- ROBINSON, S.I., NELKIN, B.D. and VOGELSTEIN, B. (1982)
The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix
of chicken oviduct cells.
Cell, 28, 99-106.
- ROSEN, O.M., HERRERA, R., OLOWE, Y., PETRUZZELLI, L.M. and COBB, M.H.
(1983)
Phosphorylation activates the insulin receptor tyrosine
protein kinase.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 3237-3240.
- ROSS, A.H., BALTIMORE, D. and EISEN, H.N. (1981)
Phosphotyrosine-containing proteins isolated by affinity
chromatography with antibodies to a synthetic hapten.
Nature, 294, 654-656.
- RUBIN, C.S. and ROSEN, O.M. (1975)
Protein phosphorylation.
Ann.Rev.Biochem., 44, 831-887.
- RUIZ-CARRILLO, A., WANGH, L.J. and ALLFREY, V.G. (1975)
Processing of newly synthesized histone molecules. Nascent
histone H4 chains are reversibly phosphorylated and ace-
tylated.
Science, 190, 117-128.
- RUIZ-CARRILLO, A. and JORCANO, J.L. (1979)
An octamer of core histones in solution : central role of
the H3-H4 tetramer in the self-assembly.
Biochemistry, 18, 760-768.
- SAFFER, J.D. and GLAZER, R.I. (1982)
The phosphorylation of high mobility group proteins 14
and 17 and their distribution in chromatin.
J.Biol.Chem., 257, 4655-4660.
- SANDEEN, G., WOOD, W.I. and FELSENFELD, G. (1980)
The interaction of high mobility proteins HMG 14 and 17
with nucleosomes.
Nucleic Acids Research, 8, 3757-3778.
- SCHLEPPER, J. and KNIPPERS, R. (1975)
Nuclear protein kinases from murine cells.
Eur.J.Biochem., 60, 209-220.
- SCULLEY, T.B. and MACKINLAY, A.G. (1982)
Substrate specificity studies on a calf thymus nuclear
phosphoprotein kinase.
Eur.J.Biochem., 124, 449-455.
- SEALY, L. and CHALKLEY, R. (1978-a)
DNA associated with hyperacetylated histone is preferen-
tially digested by DNase.
Nucleic Acids Research, 5, 1863-1876.

- SEALY, L. and CHALKLEY, R. (1978-b)
The effect of sodium butyrate on histone modification.
Cell, 14, 115-121.
- SEYEDIN, S.M. and KISTLER, W.S. (1979)
Levels of chromosomal protein high mobility group 2 parallel the proliferative activity of testis, skeletal muscle, and other organs.
J.Biol.Chem., 254, 11264-11271.
- SHEPHERD, G.R. (1973)
Evidence for the biological coupling of biosynthesis and internal acetylation of histone fraction F2a1 (IV) in cultured mammalian cells.
Biochim.Biophys.Acta, 299, 485-491.
- SHLYAPNIKOV, S.V., ARUTYUNYAN, A.A., KUROCHKIN, S.N., MEMELOVA, L.V., NESTEROVA, M.V., SASHCHENKO, L.P. and SEVERIN, E.S. (1975)
Investigation of the sites phosphorylated in lysine-rich histones by protein kinase from pig brain.
FEBS Letters, 53, 316-319.
- SIEBERT, G., ORD, M.G. and STOCKEN, L.A. (1971)
Histone phosphokinase activity in nuclear and cytoplasmic cell fractions from normal and regenerating rat livers.
Biochem.J., 122, 721-725.
- SIMPSON, R.T. (1978)
Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones.
Biochemistry, 17, 5524-5531.
- SKANDRANI, E., MIZON, J., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1972)
Etude de la fraction F2b des histones de thymus de Veau.
Biochimie, 54, 1267-1272.
- SMERDON, M.J. and ISENBERG, I. (1976)
Interactions between the subfractions of calf thymus H1 and nonhistone chromosomal proteins HMG 1 and HMG 2.
Biochemistry, 15, 4242-4247.
- SMITH, J.A. and STOCKEN, L.A. (1975)
Chemical and metabolic properties of adenosine diphosphate ribose derivatives of nuclear proteins.
Biochem.J., 147, 523-529.
- SMITH, L.S., KERN, C.W., HALPERN, R.M. and SMITH, R.A. (1976)
Phosphorylation on basic amino acids in myelin basic protein.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 71, 459-465.
- STALDER, J., SEEBECK, T. and BRAUN, R. (1978)
Actin amino-acid sequence.
Eur.J.Biochem., 90, 451-463.

- STERNER, R., VIDALI, G. and ALLFREY, V.G. (1979)
Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins.
J. Biol. Chem., 254, 11577-11583.
- STONE, P.R., LORIMER, W.S. and KIDWELL, W.R. (1977)
Properties of the complex between histone H1 and poly (ADP-ribose) synthesised in Hela cell nuclei.
Eur. J. Biochem., 81, 9-18.
- SUAU, P., BRADBURY, E.M. and BALDWIN, J.P. (1979)
Higher order structures of chromatin in solution.
Eur. J. Biochem., 97, 593-602.
- SURES, I. and GALLWITZ, D. (1980)
Histone-specific acetyltransferases from calf thymus. Isolation, properties and substrate specificity of three different enzymes.
Biochemistry, 19, 943-951.
- SZOPA, J., JACOB, G. and ARFMANN, H.A. (1980)
Influence of histone phosphorylation upon histone-histone interactions studied *in vitro*.
Biochemistry, 19, 987-990.
- TAKAHASHI, S. (1976)
Variation of activity of cyclic nucleotide-dependent kinases during development of the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Biochem., 6, 519-523.
- TANAKA, M., HAYASHI, K., SAKURA, H., MIWA, M., MATSUSHIMA, T. and SUGIMURA, T. (1978)
Demonstration of high molecular weight poly(adenosine diphosphate ribose).
Nucleic Acids Research, 5, 3183-3194.
- TANPHAICHITR, N., MOORE, K.C., GRANNER, D.K. and CHALKLEY, R. (1976)
Relationship between chromosome condensation and metaphase lysine-rich histone phosphorylation.
J. Cell Biol., 69, 43-50.
- TANUMA, S.I. and JOHNSON, G.S. (1983)
ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells.
J. Biol. Chem., 258, 4067-4070.
- THI MAN, N. and SHALL, S. (1982)
The alkylating agent, dimethyl sulphate, stimulates ADP-ribosylation of histone H1 and other proteins in permeabilised mouse lymphoma (L 1210) cells.
Eur. J. Biochem., 126, 83-88.

- THOMA, F., KOLLER, Th. and KLUG, A. (1979)
Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.
J. Cell Biol., 83, 403-427.
- THOMAS, J.O. and KORNBERG, R.D. (1975)
An octamer of histones in chromatin and free in solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2626-2630.
- THOMAS, J.O. and KHABAZA, A.J.A. (1980)
Cross-linking of histone H1 in chromatin.
Eur. J. Biochem., 112, 501-511.
- TREMPE, J. and LEFFAK, M. (1982)
Assembly of semihistone A24.
Nucleic Acids Research, 10, 5467-5481.
- UY, R. and WOLD, F. (1977)
Posttranslational covalent modification of proteins. Only 20 amino acids are used in protein synthesis, yet some 140 "amino acids" are found in various proteins.
Science, 198, 890-896.
- VAN EEKELEN, C.A.G. and VAN VENROOIJ, W.J. (1981)
hn RNA and its attachment to a nuclear protein matrix.
J. Cell Biol., 88, 554-563.
- VAN OBBERGHEN, E. and KOWALSKI, A. (1982)
Phosphorylation of the hepatic insulin receptor. Stimulating effect of insulin on intact cells and in a cell-free system.
FEBS Letters, 143, 179-182.
- VARDANIS, A. (1980)
A unique cyclic nucleotide-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem., 255, 7238-7243.
- VAVRA, K.J., ALLIS, C.D. and GOROVSKY, M.A. (1982)
Regulation of histone acetylation in *Tetrahymena* macro- and micronuclei.
J. Biol. Chem., 257, 2591-2598.
- VIDALI, G., BOFFA, L. and ALLFREY, V.G. (1977)
Selective release of chromosomal proteins during limited DNase I digestion of avian erythrocyte chromatin.
Cell, 12, 409-415.
- VIDALI, G., BOFFA, L.C., BRADBURY, E.M. and ALLFREY, V.G. (1978)
Butyrate suppression of histone deacetylation leads to an accumulation of multi-acetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2239-2243.

- WALKER, J.M., HASTINGS, J.R.B. and JOHNS, E.W. (1978)
A novel continuous sequence of H1 aspartic and glutamic residues in a non-histone chromosomal protein.
Nature, 271, 281-282.
- WALSH, D.A., PERKINS, J.P. and KREBS, E.G. (1968)
An adenosine 3'-5' monophosphate dependent protein kinase from Rabbit skeletal muscle.
J.Biol.Chem., 243, 3763-3765.
- WALTON, G.M., SPIESS, J. and GILL, G.N. (1982)
Phosphorylation of high mobility group 14 protein by cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
J.Biol.Chem., 257, 4661-4668.
- WANG, J.Y.J. and KOSHLAND, D.E. Jr (1978)
Evidence for protein kinase activities in the Prokaryote *Salmonella typhimurium*.
J.Biol.Chem., 253, 7605-7608.
- WANG, J.C. (1982)
The path of DNA in the nucleosome.
Cell, 29, 724-726.
- WATERBORG, J.H. and MATTHEWS, H.R. (1983)
Patterns of histone acetylation in the cell cycle of *Physarum polycephalum*.
Biochemistry, 22, 1489-1496.
- WEINTRAUB, H. and GROUDINE, M. (1976)
Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation.
Science, 193, 848-856.
- WEINTRAUB, H., LARSEN, A. and GROUDINE, M. (1981)
 α -globin-gene switching during the development of chicken embryos : expression and chromosome structure.
Cell, 24, 333-344.
- WEISBROD, S., GROUDINE, M. and WEINTRAUB, H. (1980)
Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes.
Cell, 19, 289-301.
- WEST, M.H.P. and BONNER, W.M. (1980)
Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin.
Nucleic Acids Research, 8, 4671-4680.
- WHISH, W.J.D., DAVIES, M.I. and SHALL, S. (1975)
Stimulation of poly (ADP-ribose) polymerase activity by the anti-tumour antibiotic, streptozotocin.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 65, 722-730.

- WHITLOCK, J. and SIMPSON, R.T. (1977)
Localization of the sites along the nucleosome DNA which interact with NH-terminal histone regions.
J.Biol.Chem., 252, 6516-6520.
- WHITLOCK, J.P., AUGUSTINE, R. and SCHULMAN, H. (1980)
Calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in butyrate-treated Hela cells.
Nature, 287, 74-76.
- WHITLOCK, J.P., GALEAZZI, D.Jr and SCHULMAN, H. (1983)
Acetylation and calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in nuclei from butyrate-treated Hela cells.
J.Biol.Chem., 258, 1299-1304.
- WILKINSON, D.J., SHINDE, B.G. and HOHMANN, P. (1982)
Cell-specific phosphorylation of H1 histone subtypes among different Chinese Hamster cell lines in interphase.
J.Biol.Chem., 257, 1247-1252.
- WONG, N.C.W., POIRIER, G.G. and DIXON, G.H. (1977)
Adenosine diphosphoribosylation of certain basic chromosomal proteins in isolated trout testis nuclei.
Eur.J.Biochem., 77, 11-21.
- WONG, M., KANAI, Y., MIWA, M., BUSTIN, M. and SMULSON, M. (1983)
Immunological evidence for the *in vivo* occurrence of a crosslinked complex of poly (ADP-ribosylated) histone-H1.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, 205-209.
- WOODCOCK, C.L.F. (1973)
Ultrastructure of inactive chromatin.
J.Cell Biol., 59, 368
- WOUTERS-TYROU, D., MARTIN-PONTHIEU, A., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1981)
Acetylation of histone H4 in Chicken erythrocyte and Cuttle-fish testis chromatin.
FEBS Letters, 128, 195-200.
- YAMAMOTO, M., CRISS, W.E., TAKAI, Y., YAMAMURA, H. and NISHIZUKA, Y. (1979)
A hepatic soluble cyclic nucleotide-independent protein kinase. Stimulation by basic polypeptides.
J.Biol.Chem., 254, 5049-5052.
- ZEILIG, C.E., LANGAN, T.A. and GLASS, D.B. (1981)
Sites in histone H1 selectively phosphorylated by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase.
J.Biol.Chem., 256, 994-1001.
- ZICK, Y., WHITTAKER, J. and ROTH, J. (1983)
Insulin stimulated phosphorylation of its own receptor. Activation of a tyrosine-specific protein kinase that is tightly associated with the receptor.
J.Biol.Chem., 258, 3431-3434.

CHAPITRE III

ETUDES STRUCTURALES: HISTONES H2A ET H2B DE GONADES D'ÉTOILE DE MER,
ELEMENTS D'UN DIMERE CONSTITUTIF DU NUCLEOSOME

PLAN DU CHAPITRE III

ETUDES STRUCTURALES : HISTONES H2A ET H2B DE GONADES D'ETOILE
DE MER, ELEMENTS D'UN DIMERE CONSTITUTIF DU NUCLEOSOME.

III - 1 CHOIX DU MATERIEL D'ETUDE

III - 2 STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION DE LA SEQUENCE
EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B D'ETOILE DE MER

Publication 1

*Primary structure of histone H2A from gonads of the starfish
Asterias rubens.*

A.MARTINAGE, D.BELAÏCHE, T.DUPRESSOIR and P.SAUTIERE
Eur.J.Biochem. (1983), 130, 465-472.

Publication 2

*Primary structure of histone H2B from gonads of the starfish
Asterias rubens.*

A.MARTINAGE, G.BRIAND, A.VAN DORSSELAER, C.CRANE-ROBINSON and
P.SAUTIERE.

Manuscrit en préparation.

III - 3 DISCUSSION

III - 1 CHOIX DU MATERIEL D'ETUDE

A de rares exceptions près rencontrées chez les Eucaryotes inférieurs (*Saccharomyces* et *Tetrahymena*) la stabilité structurale des histones riches en arginine H3 et H4 est maintenant bien établie. Cette stabilité implique pour ces histones une fonction hautement spécifique liée à la conformation exacte de la molécule. En effet, ces histones jouent un rôle essentiel dans l'organisation de la structure nucléosomale et leur association en tétramère est suffisante pour conférer au DNA une structure semblable à celle du nucléosome. Les autres histones de la "core particle" H2A et H2B présentent un caractère évolutif nettement plus marqué, d'abord suggéré par des variations dans la mobilité électrophorétique de ces histones isolées de tissus ou d'espèces différentes.

En étudiant plus particulièrement la structure primaire de l'histone H2A, notre laboratoire a mis en évidence dès 1976 la présence de microhétérogénéité dans cette histone isolée de tumeur de chloroleucémie de Rat (LAINE et coll., 1976). Puis la mise au point d'une méthode électrophorétique utilisant des détergents non ioniques tel que le Triton X-100, permet la séparation d'histones de structure très voisine (FRANKLIN et ZWEIDLER, 1977). Ainsi, de nombreux variants d'histones ont été isolés et l'on connaît par exemple quatre variants de l'histone H2A isolée de cellules Hela, de l'érythrocyte de Poulet et de différents tissus de la Souris (WEST et BONNER, 1980).

Le rôle des variants d'histones n'est pas parfaitement élucidé. Toutefois, leur présence à certains stades du développement fait penser qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la structure et la fonction de la chromatine au cours de la différenciation (ALLIS et coll., 1980).

Chez les mammifères, la cellule synthétise, au cours de la spermatogénèse, un large éventail de variants différemment exprimés suivant le stade considéré. Ces variants contribuent à la modification de la structure de la chromatine nécessaire au moment de la spermiogénèse (TROSTLE-WEIGE et coll., 1982). L'importance de ces variants est renforcée par le fait que les macro-noyaux de *Tetrahymena thermophila* qui sont transcriptionnellement actifs, renferment des variants non retrouvés dans les micro-noyaux transcriptionnellement inactifs de ce protozoaire cilié (ALLIS et coll., 1980). Leur présence pourrait être le reflet de l'activité ou du blocage de gènes aux différents stades d'organisation de l'être vivant.

Les variants entraînent une hétérogénéité au sein des nucléosomes et leur présence implique une modification de conformation et d'interaction des protéines entre elles ou (et) des protéines avec le DNA. L'étude de la structure primaire de l'histone H2A d'organismes primitifs (Publication 1) nous apparut alors comme une acquisition nécessaire :

- à la détermination des domaines de séquence conservée au cours de l'évolution donc nécessaires à l'activité biologique de la protéine.

- à la recherche de variants éventuels
- à la localisation de mutations dans la séquence : en effet, suivant leur localisation, les mutations peuvent entraîner:
 - . une variation dans le degré d'acétylation (substitution de résidus de lysine) ou (et) de phosphorylation (substitution de résidus de sérine).
 - . une modification dans les domaines d'interaction protéine-protéine et en particulier, dans les domaines d'interaction de l'histone H2A avec l'histone H2B. Pour cela, la connaissance de la structure primaire de l'histone H2B était également nécessaire : ceci nous a amené à étudier parallèlement ces deux histones. Une partie de ces travaux a été réalisée sur le dimère H2A-H2B qui, soumis à une hydrolyse enzymatique douce, nous a permis de localiser les zones d'interaction des deux protéines tout en évitant la purification de chacune d'entre elles.

Les histones H2A et H2B ont un caractère évolutif similaire et des variants de l'histone H2B comme de l'histone H2A ont été isolés, en particulier, le sperme d'Oursin renferme trois histones H2B différentes (STRICKLAND et coll., 1978). La détermination de la structure primaire de ces trois histones révèle une variation très importante de la nature et de la taille de la région NH₂-terminale. En réalité, ces caractéristiques inhabituelles de l'histone H2B peuvent être liées à la nature du matériel choisi (le sperme) ou à son origine (Oursin).

Ceci nous a conduit à étudier les histones H2A et H2B (Publications 1 et 2) d'organismes primitifs dans l'échelle de l'évolution : les Echinodermes.

La raison de ce choix est double :

- Les Echinodermes sont des Invertébrés marins qui, sur l'arbre phylogénétique du règne animal (Figure 15) se placent sur la branche gauche qui donne naissance au groupe des Vertébrés. Ils occupent là une position tout à fait particulière par rapport à la grande majorité des Invertébrés (Vers, Mollusques, Arthropodes) qui se placent sur la branche droite de l'arbre phylogénétique.

Par leur caractère très primitif et leur position éloignée de celle des Mammifères, les Echinodermes constituent un matériel intéressant pour l'étude des histones. De plus, ce travail s'inscrit dans un ensemble de recherches menées, dans le laboratoire du Docteur Pierre SAUTIERE, par Danièle WOUTERS et Daniel KMIECIK sur les histones d'un Cephalopode (*Sepia officinalis*) et d'un Ver marin (*Sipunculus nudus*), deux Invertébrés marins situés sur la branche droite de l'arbre phylogénétique qui aboutit aux Insectes.

- La situation géographique de notre laboratoire nous permet d'entretenir une collaboration efficace avec la Station Marine de Wimereux qui nous fournit la matériel biologique nécessaire à nos études.

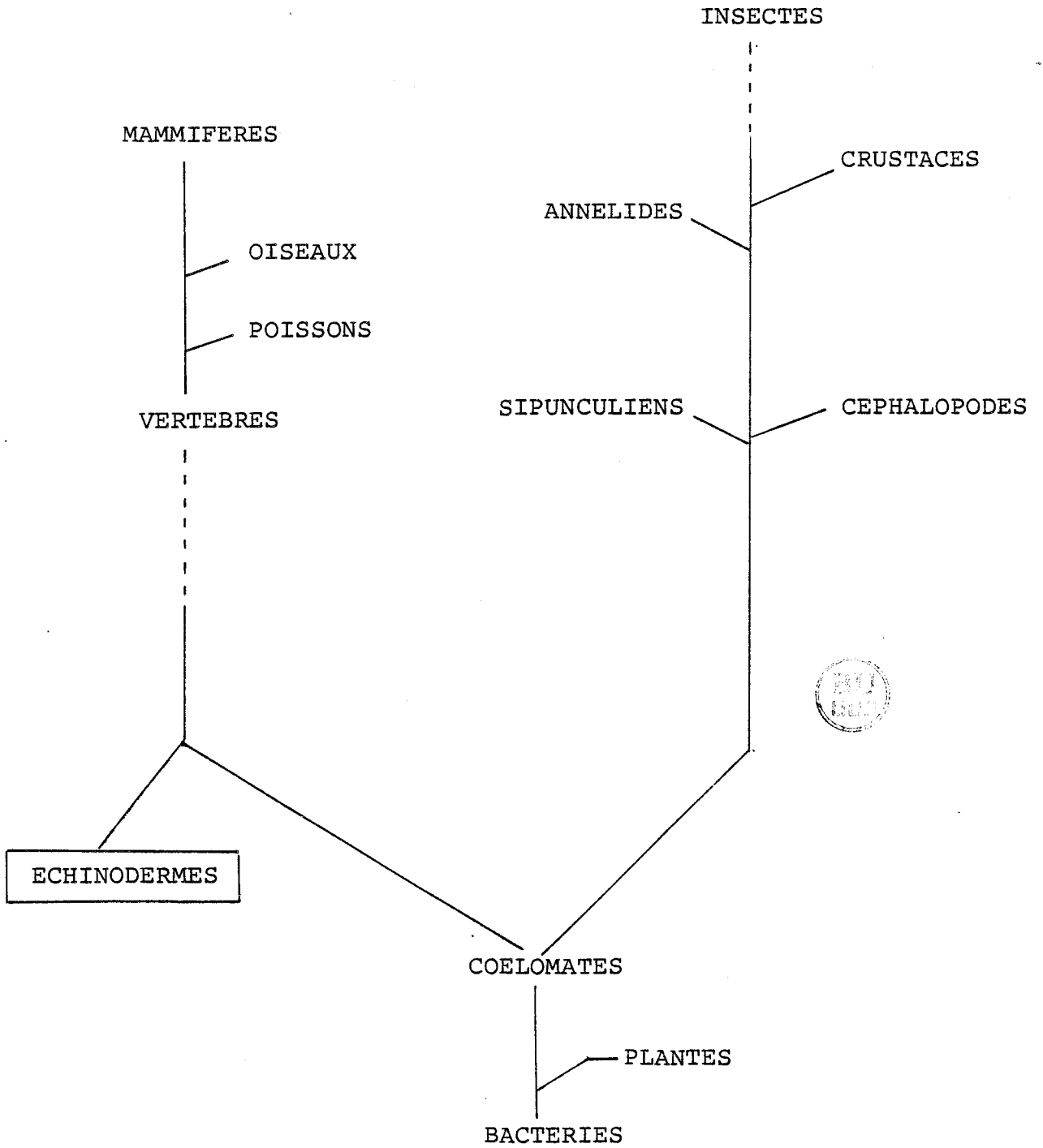


FIGURE 15 POSITION DES ECHINODERMES DANS L'ARBRE PHYLOGENETIQUE

III - 2 STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION DE LA SEQUENCE
EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B D'ETOILE DE MER

La figure 16 schématise la stratégie que nous avons adoptée pour déterminer la séquence en acides aminés des histones H2A et H2B d'Etoile de mer. Le but de la méthodologie choisie est d'obtenir un petit nombre de longs fragments peptidiques facilement isolés et purifiés par chromatographie de gel-filtration et pouvant être soumis ensuite à la dégradation automatique de EDMAN. Ceci a été réalisé, compte tenu de la composition en acides aminés de chaque protéine, par l'emploi d'enzymes de haute spécificité (protéase staphylococcique, protéase de glande sous-maxillaire de Souris : protéase Arg-C) et par le choix des conditions d'hydrolyse enzymatique : pH, température, rapport enzyme/substrat.

Ainsi à pH 4.0 et dans un tampon acétate d'ammonium, la protéase staphylococcique V8 coupe uniquement les liaisons glutamyles.

Par ailleurs, en plaçant le dimère H2A-H2B dans un milieu tamponné à pH 8.3, à force ionique élevée (0.5M), les fortes interactions entre les régions hydrophobes des protéines délimitent un domaine protégé inaccessible au clivage protéolytique par les enzymes. Dans ces conditions, l'endoprotéinase Arg-C spécifique des liaisons arginyles, utilisée dans un rapport enzyme/substrat de 1/5000 et à température ambiante, ne

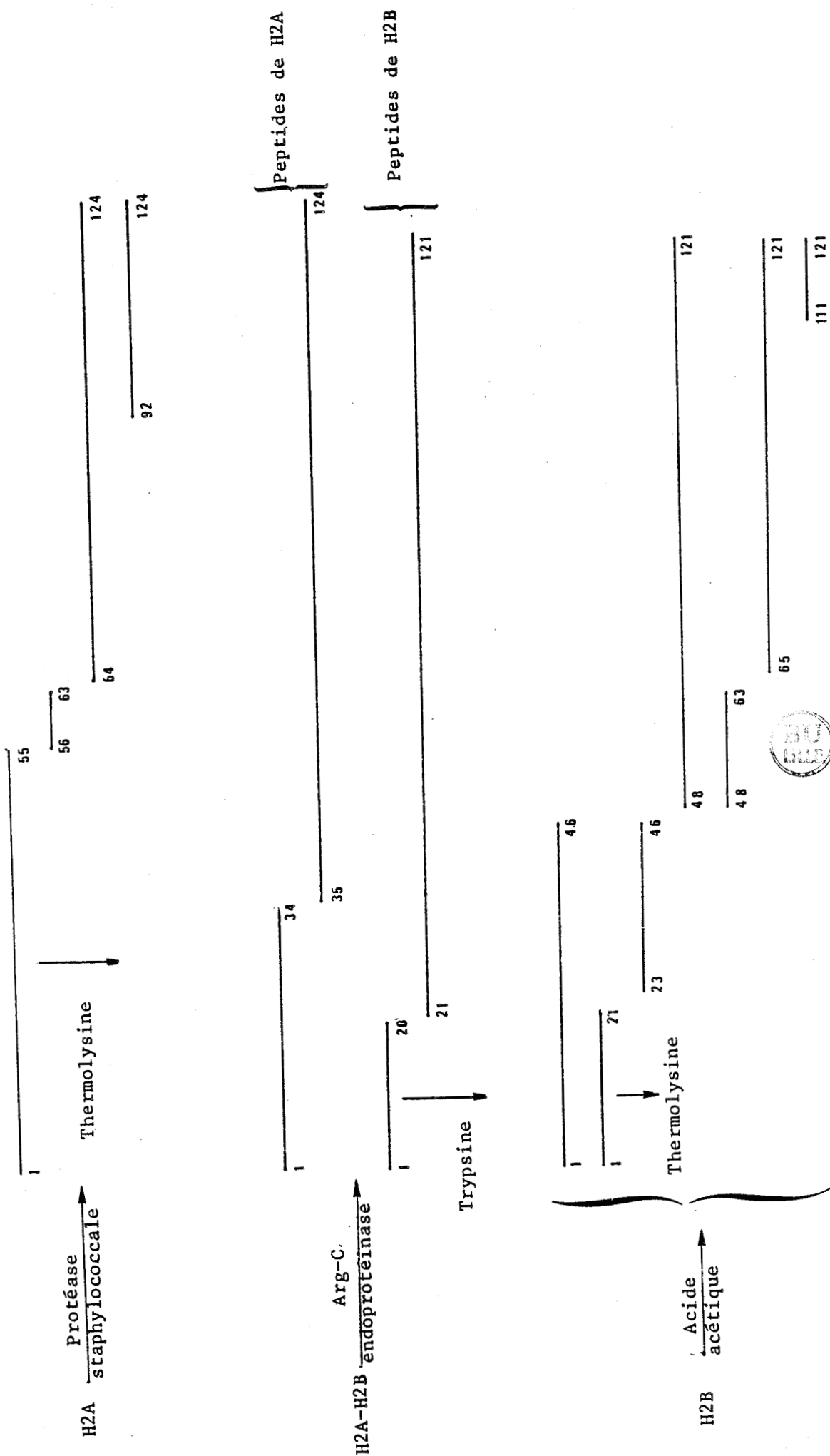


FIGURE 16 STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B

clive ces liaisons arginyles que dans la région N-terminale de la protéine, région restée libre de toute interaction et donc accessible à l'enzyme.

D'autre part, le clivage par l'acide acétique 0.25M des trois liaisons aspartyles présentes dans l'histone H2B d'Etoile de mer a permis d'obtenir de gros fragments peptidiques nécessaires à l'étude structurale de cette protéine.

L'action d'enzymes comme la trypsine, la thermolysine, la pepsine sur les longs peptides N-terminaux obtenus précédemment (1 à 55 pour H2A ; 1 à 20 et 1 à 21 pour H2B) ou sur la protéine intacte a libéré des petits peptides nécessaires à l'étude de la région N-terminale des histones H2A et H2B dont l'extrémité N-terminale est bloquée et qui ne pouvaient donc être soumis à la dégradation automatique de EDMAN.

Primary Structure of Histone H2A from Gonads of the Starfish *Asterias rubens*

Arlette MARTINAGE, Denise BELAICHE, Thierry DUPRESSOIR, and Pierre SAUTIERE

Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lille

(Received August 25/November 2, 1982) — EJB 5936

The complete amino acid sequence (124 residues) of histone H2A from gonads of the starfish *Asterias rubens* has been established from automated sequence analyses of large fragments obtained by staphylococcal protease digestion of histone H2A and by limited hydrolysis of H2A-H2B complex with mouse submaxillary gland protease and from structural studies of peptides generated by enzymatic hydrolyses of these fragments or of the protein.

By comparison with calf homologous histone, the starfish histone H2A shows 5 deletions and 12 substitutions. Half of the substitutions are non-conservative.

Microheterogeneities were found at positions 18, 40 and 50 and result in the existence of at least two variants of starfish gonad histone H2A.

Structural studies of histones H2A from different species widely separated on the evolutionary scale [1–6] have shown that extensive structural modifications (point mutations, deletions and insertions) mainly occur in the highly basic N-terminal and C-terminal parts of the protein. The central region of the molecule (residues 18–118), which strongly interacts with the region 32–125 of histone H2B to form the dimer H2A-H2B in the nucleosome, appears generally conserved during evolution.

The higher degree of variability of histone H2B in Echinidae [7], one of the three families of the echinoderms has led us to investigate the primary structure of both histones H2A and H2B in Asterinidae.

In this paper we report the complete amino acid sequence of histone H2A from gonads of the starfish *Asterias rubens*.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Mature starfish were obtained from the Institut de Biologie Maritime de Wimereux (France). After excision, gonads were frozen in solid CO₂ and kept at –20°C until use.

Staphylococcus aureus V8 protease was from Miles laboratories. Trypsin (treated with TosPheCH₂Cl), carboxypeptidases A and B (treated with PhMeSO₂F) and pepsin were obtained from Worthington. Thermolysin was from Merck. Arg-C endoproteinase from the submaxillary glands of mice was purchased from Boehringer.

Dimethylallylamine, propane-1-ol and dithioerythritol were sequanal grade from Pierce. Benzene and chloro-1-butane for sequential analysis were purchased from SDS (Peypin, France). Phenylisothiocyanate, heptane and hepta-

Abbreviations. TosPheCH₂Cl, *N*-tosylphenylalanyl chloromethane; PhMeSO₂F, phenylmethylsulfonyl fluoride.

Enzymes (IUB Recommendations 1978). *Staphylococcus aureus* protease (EC 3.4.21.19); trypsin (EC 3.4.21.4); pepsin (EC 3.4.23.1); thermolysin (EC 3.4.24.4); endoproteinase Arg-C (EC 3.4.–.–); carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1); carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2).

fluorobutyric acid were sequanal grade from Beckman. Polybrene was purchased from Aldrich and the dipeptide Gly-Gly from Sigma. All other reagents were of the highest purity available.

Isolation of Histone H2A and of Histone Complex H2A-H2B

Chromatin was isolated from gonads as described in [8]. The crude fraction F2a2 was obtained from chromatin according to [9]. The crude fraction F2b was extracted from chromatin by method 2 of Johns [10]. Histone H2A was isolated from fraction F2a2 by gel filtration chromatography on Bio-Gel P10 (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

The dimer H2A-H2B was obtained from fraction F2b by ion-exchange chromatography on Bio-Rex 70 (100 × 2.5 cm) [11]. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) containing 8% guanidine chloride and eluted with a linear gradient of the latter from 8% to 14% in the same buffer.

Analytical electrophoresis of histone H2A and of complex H2A-H2B in polyacrylamide slab gels was carried out at pH 3.2 in 6.25 M urea according to Panyim and Chalkley [12] using a 17% acrylamide concentration.

Amino acid analyses of histone samples were performed on a Beckman 119 CL amino acid analyser after hydrolysis in 6 M HCl (1 ml/mg protein) in a vacuum at 110°C for 24 h and 72 h with one drop of 1% phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Structural Studies

Identification of the Blocking Group at the Amino-terminal End. This identification was made by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of the amino-terminal tryptic peptide (residues 1–3) of histone H2A with a Bruker 270-MHz Fourier transform spectrometer. Spectra were obtained in ²H₂O at pH ≈ 2 and pH ≈ 11 in 5-mm tubes.

Carboxy-terminal Analysis. Histone H2A (1.4 mg, 100 nmol) was dissolved in 0.5 ml 0.2 M *N*-methylmorpho-

line acetate pH 8.0 and digested at 40 °C with carboxypeptidase B (40 µg). At 30 min an aliquot was taken off, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. Carboxypeptidase A (40 µg) was then added. Aliquots were taken off at 45 min, 60 min and 90 min and treated as above. The released amino acids were analysed on the amino acid analyser. Digestion of peptides with carboxypeptidase A and/or B was performed in the same conditions.

Enzymatic Hydrolyses. Histone H2A (70 mg, 5 µmol) was hydrolysed with V8 staphylococcal protease in 0.05 M ammonium acetate (14 ml) at pH 4.0 and 37 °C for 15 h, using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w). The N-terminal fragment (residues 1–55) so obtained was further hydrolysed by thermolysin in 0.1 M *N*-methylmorpholine acetate at pH 8.0 and 40 °C for 2 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:60 (w/w). Hydrolysis of the protein (40 mg ≈ 3 µmol) with TosPheCH₂Cl-trypsin was carried out in 0.1 M *N*-methylmorpholine acetate at pH 8.0 and 37 °C for 2 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w). Histone H2A (60 mg ≈ 4 µmol) was hydrolysed with pepsin in 5% formic acid at 37 °C for 1 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w). The complex H2A-H2B was submitted to a limited hydrolysis with Arg-C endoproteinase in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.3 containing 0.5 M NaCl at room temperature for 5 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:5000 (w/w). The enzymatic hydrolysates were freeze-dried and submitted to fractionation.

Fractionation of Peptides. The peptides obtained by hydrolysis of histone H2A with V8 staphylococcal protease and by hydrolysis of the complex H2A-H2B with Arg-C endoproteinase were separated by chromatography on a Bio-Gel P10 column (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. When necessary, peptides were further purified by chromatography on a Sephadex

G-50F column (200 × 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Thermolysin, trypsin and pepsin hydrolysates were fractionated by ion-exchange chromatography on a Chromobeads P column (Technicon Corporation) with pyridine formate and pyridine acetate buffers [6]. The purity of the peptides was checked by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea [13] using a 17% acrylamide concentration, or by paper chromatography and electrophoresis [14].

Sequence of Peptides. Small peptides were sequenced by manual Edman degradation [15] and large peptides by automated Edman degradation using a Beckman 890 C sequencer with a dimethylallylamine program (102974) in the presence of polybrene [16,17]. Identification and quantification of phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were performed by high-pressure liquid chromatography on a column of C18 µBondapak (Waters Associates) using a Hewlett-Packard liquid chromatograph 1084 B [18]. Phenylthiohydantoin derivatives of Met, Val, Phe and Ile were identified on a Hewlett-Packard 5830 A gas chromatograph [19].

Nomenclature of Peptides. Peptides generated by cleavage of the protein at glutamyl residues with the V8 staphylococcal protease were designated SP. Tryptic, thermolysin and pepsin peptides were designated T, Th and P respectively. Peptides obtained by limited hydrolysis of the complex H2A-H2B with the Arg-C endoproteinase were designated RP.

All peptides but pepsin peptides were numbered according to their position in the amino acid sequence of the protein.

RESULTS

The crude fraction F2a2 isolated from starfish gonad chromatin according to Johns [9] contains essentially histone

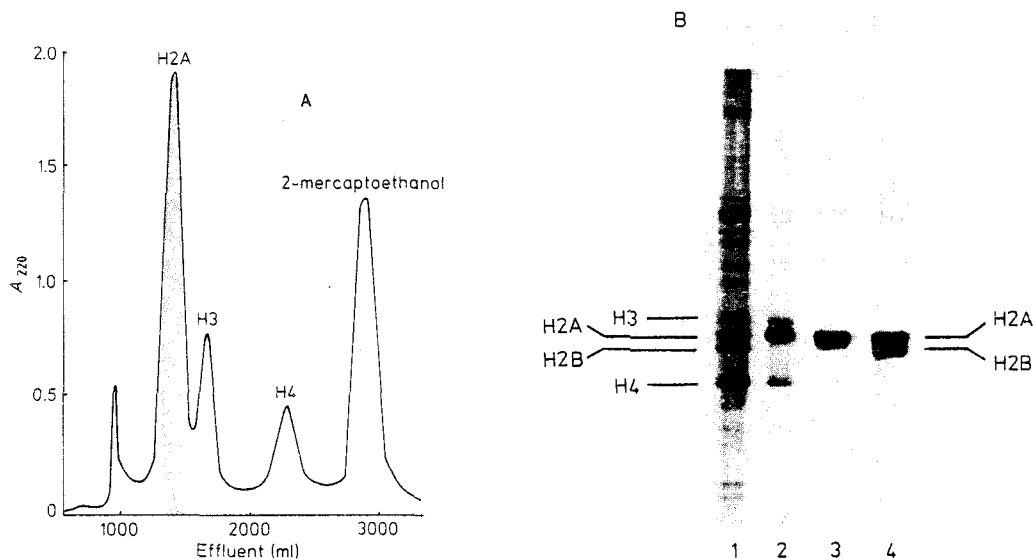


Fig. 1. (A) Biogel P10 chromatography of crude fraction F2a2 from starfish gonad chromatin. (B) Electrophoretic analysis of fractions obtained after chromatography on Biogel P10 and on Biorex 70 of crude fractions F2a2 and F2b from starfish gonad chromatin. (A) 150 mg material were dissolved in 6 ml 6 M guanidine chloride, 0.1 M Tris, pH 8.0, 5% mercaptoethanol and left under nitrogen at room temperature for 24 h before chromatography. The solution was then centrifuged and applied to a Biogel P10 column (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl, saturated with chloroform. The flow rate was 60 ml/h and 17-ml fractions were collected. (B) Electrophoresis was performed on polyacrylamide slab gel (15 × 10 cm) at 22 mA for 3 h at pH 3.2 in 6.25 M urea [12]. Migration was from top to bottom. Slabs were stained for 60 min with 0.5% Coomassie blue R in acetic acid/ethanol/water (1:2:7, by vol.) and destained by diffusion in the mixture acetic acid/ethanol/water (7:20:73, by vol.). Slot 1: whole histone from starfish gonad; slot 2: crude histone fraction F2a2; slot 3: H2A from Fig. 1A; slot 4: dimer H2A-H2B obtained by ion-exchange chromatography on Biorex 70

Table 1. Amino acid composition of starfish histone H2A and of peptides used for the sequence determination

Results are expressed as the number of residues/mol protein or peptide. Values in parentheses are residues/mol derived from the final sequence. Values for threonine and serine, in the protein, are zero-time extrapolations

Amino acids	Histone H2A		SP-1 (residues 1–55)	SP-2 (residues 56–63)	SP-3 (residues 64–124)	SP-3b (residues 92–124)	RP-1 (residues 35–124)
	calf [2]	starfish					
Aspartic acid	8	9.0 (9–10) ^a	1.2 (1–2) ^a		7.7 (8)	2.3 (2)	9.0 (9)
Threonine	5	2.9 (3)			2.8 (3)	1.9 (2)	3.0 (3)
Serine	4	4.2 (4–5) ^a	3.0 (3–4) ^a		1.1 (1)	1.1 (1)	1.8 (1)
Glutamic acid	12	10.4 (10)	2.5 (3)	2.1 (2)	5.8 (5)	2.8 (3)	9.3 (9)
Proline	5	4.8 (5)	2.2 (2)		3.1 (3)	2.1 (2)	3.5 (4)
Glycine	14	12.3 (13)	8.7 (9)		4.3 (4)	3.2 (3)	7.3 (7)
Alanine	16	18.8 (20–21) ^a	9.2 (9–10) ^a	2.0 (2)	8.8 (9)	5.0 (5)	16.7 (16)
Valine	8	7.6 (8)	5.0 (5)		3.0 (3)	3.0 (3)	5.9 (6)
Methionine		0.8 (1)	1.0 (1)				0.5 (1)
Isoleucine	6	4.6 (5)		0.8 (1)	3.9 (4)	2.0 (2)	4.7 (5)
Leucine	16	13.1 (13–14) ^a	3.1 (2–3) ^a	1.9 (2)	8.3 (9)	6.0 (6)	11.9 (12)
Tyrosine	3	2.7 (3)	1.6 (2)	0.9 (1)			2.7 (3)
Phenylalanine	1	2.0 (2)	2.2 (2)				
Histidine	4	2.1 (2)	1.0 (1)		1.0 (1)		1.1 (1)
Lysine	14	11.5 (12)	4.9 (5)		6.8 (7)	5.0 (5)	8.5 (8)
Arginine	12	11.2 (12)	7.5 (8)		3.8 (4)		5.3 (5)
Number of residues	129	124	55	8	61	34	90

^a The values for aspartic acid, serine, alanine and leucine take into account the presence of microheterogeneities at positions 18 and 50 in the sequence (Fig. 7)

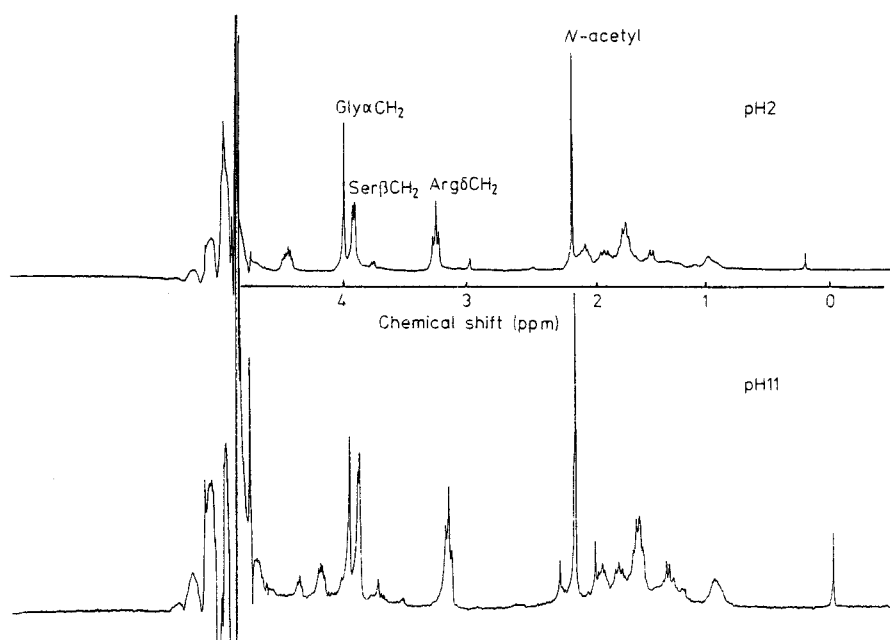


Fig. 2. 270-MHz NMR spectra of the N-terminal tryptic peptide Ac-Ser-Gly-Arg (residues 1–3) of starfish histone H2A in ²H₂O. (A) At pH 2.0; (B) at pH ≈ 11

H2A slightly contaminated by histones H3 and H4 and non-histone proteins, as shown by polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 1 B, slot 2).

Histone H2A was obtained free of contamination (Fig. 1 B, slot 3) by chromatography of F2a2 on a Bio-Gel P10 column (Fig. 1 A).

The dimer H2A-H2B was eluted at 11% guanidium chloride concentration upon ion-exchange chromatography of crude fraction F2b [11] on Bio-Rex 70 (Fig. 1 B, slot 4). This complex was used to obtain by limited proteolytic cleavage

large fragments of histones H2A and H2B without prior isolation of individual histones. Contrary to calf homologous histones, starfish histones H2A and H2B were well separated from each other by polyacrylamide gel electrophoresis in 6.25 M urea at pH 3.2 [20] (Fig. 1 B, slots 1 and 4).

Table 1 shows the amino acid composition of starfish histone H2A. By comparison with calf homologous histone, the starfish H2A is characterized by a higher content of alanine and phenylalanine, a lower content of threonine, glutamic acid, isoleucine, leucine and lysine, the presence of a methio-

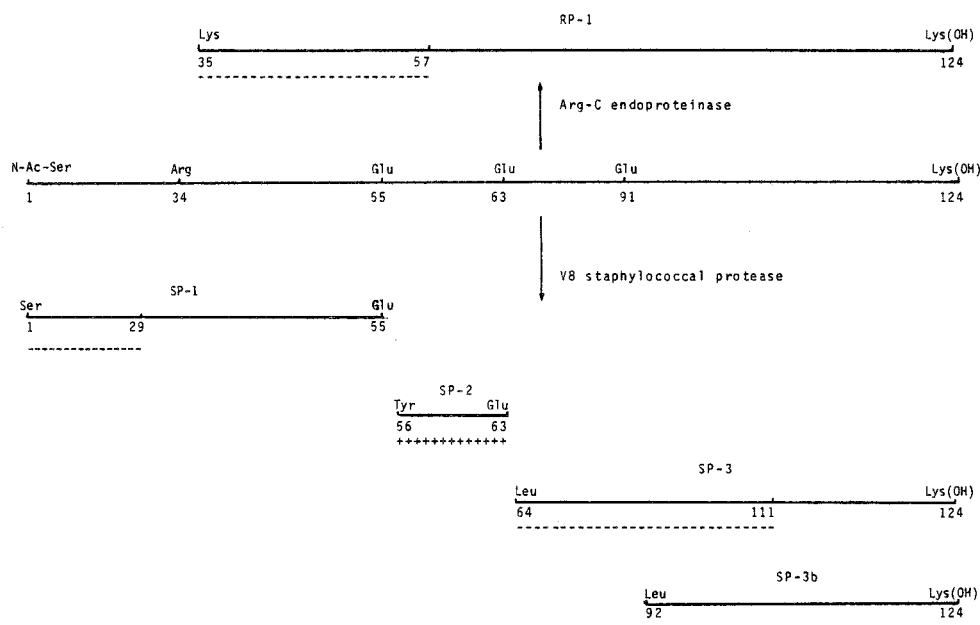


Fig. 3. Strategy used for the determination of the amino acid sequence of the starfish histone H2A. SP, V8 staphylococcal protease peptide; RP, submaxillary gland of mouse protease (Arg-C endoproteinase) peptides. (— —) Automated Edman degradation; (+ + +) manual Edman degradation

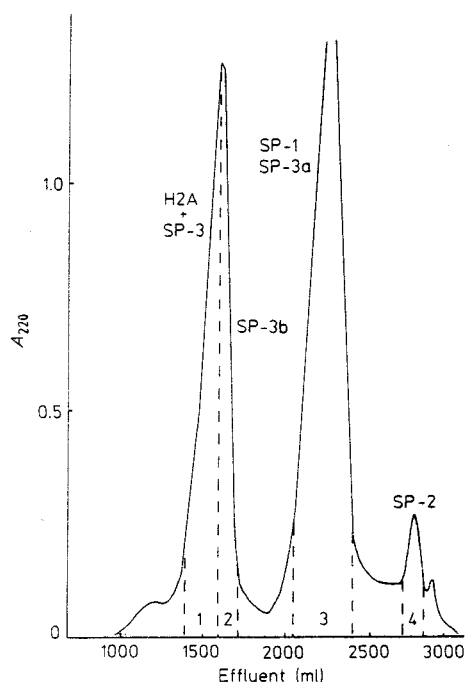


Fig. 4. Elution pattern of staphylococcal protease peptides fractionated on Bio-Gel P10. The column (150 × 5 cm) was equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Fractions of 12 ml were collected at a flow rate of 72 ml/h

nine residue and the lack of two histidine residues. Starfish histone H2A is devoid of a free amino group as established by dansylation. The blocking group was identified as acetyl by nuclear magnetic resonance spectroscopy of the amino-terminal tripeptide Ac-Ser-Gly-Arg generated by tryptic hydrolysis of the protein (Fig. 2). Digestion of starfish histone H2A with carboxypeptidases B and A led to establish the carboxy-terminal sequence as Ala-Lys(OH).

Table 2. Amino acid composition of thermolysin peptides obtained from peptide SP-1 and used to elucidate its sequence

Amino acids	Th-5 18–21	Th-8 29–32	Th-9 33–38	Th-10 39–41	Th-11 42–49	Th-12 50–52
Aspartic acid			0.9 (1)			
Threonine						
Serine						
Glutamic acid				1.2 (1)		
Proline					1.0 (1)	
Glycine	1.1 (1)		0.9 (1)		2.0 (2)	
Alanine	2.0 (2)			1.1 (1)	2.0 (2)	2.0 (2)
Valine		0.8 (1)			1.7 (2)	
Methionine						
Isoleucine						
Leucine			0.8 (1)			1.0 (1)
Tyrosine			0.8 (1)		0.4 (1)	
Phenylalanine		1.1 (1)				
Histidine		0.9 (1)				
Lysine			1.5 (1)			
Arginine	1.2 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)		

With the method of automated Edman degradation, the strategy chosen for the sequence determination of starfish histone H2A was first intended to generate a minimum of large adjacent or overlapping fragments by highly specific or limited enzymatic cleavages. In the second place, hydrolysis of the starfish histone H2A with trypsin or pepsin yielded small peptides, which were essentially used to confirm the structural data provided by the automated sequencing of the large fragments.

Thus, the cleavage of starfish histone H2A at glutamyl residue by the V8 staphylococcal protease yielded five peptides (Fig. 3), which were obtained in pure form through chromatographic separations on Bio-Gel P10 (Fig. 4) and Sephadex G-50. Their amino acid compositions are given in Table 1. Peptides SP-1, SP-2 and SP-3 together accounted for the total

Table 3. Amino acid composition of tryptic peptides obtained from starfish histone H2A and used to elucidate its amino-terminal sequence (residues 1–41)

Amino acids	T-1 1–3	T-2 4–5	T-3 6–8	T-4 9–10	T-5, T-6 11–12 13–14	T-7 15–16	T-8a 17–19	T-8b 17–19	T-9 20–28	T-10 29–31	T-11 32–34	T-12 35–41
Aspartic acid												1.0 (1)
Threonine												
Serine	0.9 (1)					0.8 (1)	1.6 (2)	0.7 (1)				
Glutamic acid									1.1 (1)			1.0 (1)
Proline									1.0 (1)			
Glycine	1.1 (1)	1.1 (1)	2.1 (2)						2.1 (2)			1.0 (1)
Alanine				1.0 (1)	1.0 (1)			1.0 (1)	1.0 (1)			1.1 (1)
Valine									1.1 (1)	0.9 (1)		
Methionine												
Isoleucine												
Leucine									1.0 (1)		1.1 (1)	
Tyrosine												0.8 (1)
Phenylalanine									1.0 (1)		0.7 (1)	
Histidine										0.8 (1)		
Lysine		1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)							1.1 (1)
Arginine	1.0 (1)			1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)

Table 4. Amino acid composition of pepsin peptides obtained from starfish histone H2A and used to elucidate its sequence

Amino acids	P-1a 39–50	P-1b 39–50	P-2 53–55	P-3 60–64	P-4 85–92	P-5 108–112	P-6 113–124
Aspartic acid	0.8 (1)				2.1 (2)	1.0 (1)	
Threonine							1.0 (1)
Serine							
Glutamic acid	1.4 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)	2.2 (2)	1.0 (1)	
Proline	1.0 (1)	0.9 (1)				1.0 (1)	0.9 (1)
Glycine	1.9 (2)	1.9 (2)					
Alanine	3.0 (3)	2.9 (3)			1.0 (1)	1.0 (1)	3.1 (3)
Valine	1.7 (2)	1.8 (2)	0.9 (1)				0.9 (1)
Methionine			0.5 (1)				
Isoleucine				1.0 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	
Leucine		1.1 (1)		1.8 (2)	1.1 (1)		2.1 (2)
Tyrosine	0.8 (1)	0.8 (1)					
Phenylalanine							
Histidine							
Lysine							4.2 (4)
Arginine	1.3 (1)	1.0 (1)			1.0 (1)		

number of residues present in the protein. The partial cleavage of the Glu⁹¹-Leu⁹² bond in the C-terminal fragment SP-3 yielded peptides SP-3a (residues 64–91) and SP-3b (residues 92–124). Since the peptide SP-1 contained most of the serine, glycine and arginine residues present in the H2A molecule, it clearly originated from the amino-terminal region of the protein (residues 1–55). The *N*-acetylserine residue present at its amino-terminal end was found partially deacetylated. Indeed, the deacetylation of the α -acetyl amino group, by a deacetylase activity present in the V8 staphylococcal protease, has already been observed in V8 staphylococcal protease hydrolysates of histones H4 and H2A [6,21]. The peptide SP-1 was, therefore, submitted successfully to automated Edman degradation over 29 steps (Fig. 7). The complete sequence of the peptide SP-1 was achieved through structural studies of thermolysin peptides generated from SP-1 (Table 2) and of peptides obtained by hydrolysis of the protein with trypsin or pepsin (Tables 3 and 4, Fig. 7).

The tryptic peptide T-1 lacked a free α -amino group. Its sequence was determined as described previously [2]. The

presence of an acetyl group at the amino-terminal end of the peptide T-1 was established by NMR spectroscopy in ²H₂O at pH 2.0 and pH \approx 11 (Fig. 2).

Among the other tryptic peptides, two originate from the same part of the molecule and result from a microheterogeneity at position 18, where a serine and an alanine residue are found, generating the tryptic peptides Ser-Ser¹⁸-Arg and Ser-Ala¹⁸-Arg. The presence of an alanine residue at position 18 was confirmed by the thermolysin peptide Th-5 Ala¹⁸-Arg-Ala-Gly²¹ (Table 2 and Fig. 7). Two of the peptides obtained by pepsin digestion of the protein, P-1a and P-1b (Fig. 5), have a similar amino acid composition except for aspartic acid and leucine (Table 4). Both peptides were obtained in equal amounts and, as shown by automated Edman degradation (Fig. 7) differ of each other at positions 40 and 50:

P-1a: Ala-Glu⁴⁰-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Asn⁵⁰

P-1b: Ala-Gln⁴⁰-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu⁵⁰.

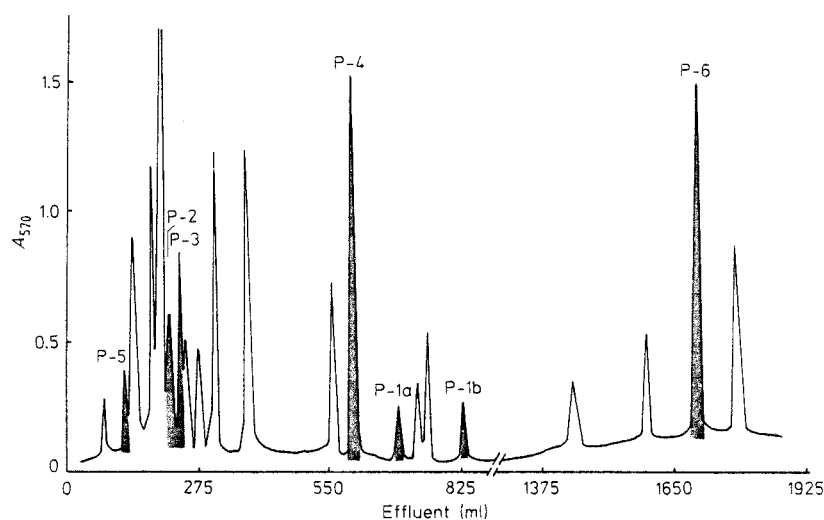


Fig. 5. Elution pattern of pepsin peptides from starfish histone H2A fractionated on Chromobeads P. The column (70 × 0.635 cm) was eluted with pyridine formate and pyridine acetate buffers used in a gradient of ionic strength and pH. Fractions of 5.5 ml were collected at a flow rate of 33 ml/h. Elution of the peptides was monitored automatically by ninhydrin reaction. Peptides used for the determination of the histone primary structure were numbered according to their position in the amino acid sequence of the protein

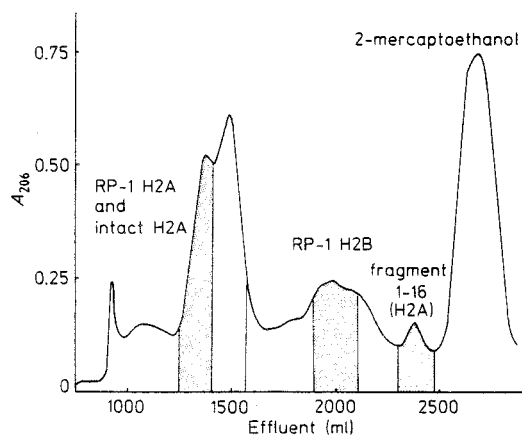


Fig. 6. Elution pattern of Arg-C endoprotease hydrolyzate of the complex H2A-H2B. The peptides were fractionated on a column of Bio-Gel P10 (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl, saturated with chloroform. Fractions of 17 ml were collected at a flow rate of 70 ml/h

Among the other pepsin peptides, the peptide P-2 is of interest since it ascertains the presence of a methionine residue at position 54 in the sequence of the protein.

The sequence of the central peptide SP-2 (residues 55–63) was established by manual Edman degradation (Fig. 7).

The sequence of the carboxy-terminal half of the starfish histone H2A was entirely elucidated from the data provided by the automated Edman degradation of peptides SP-3 and SP-3b (Table 1 and Fig. 7).

Arg-C Endoproteinase Digestion of the Dimer H2A-H2B

The limited hydrolysis of the dimer H2A-H2B by the submaxillary gland of mouse protease, highly specific for arginyl bonds, was used first with the aim of producing a large fragment of histone H2A, overlapping the staphylococcal protease fragments SP-1, SP-2 and SP-3. Indeed, the rationale of this method was to generate simultaneously large fragments of histones H2A and H2B for structural studies and to define the interacting sequences within both proteins. When

the histone dimer H2A-H2B is placed in a buffered solution at slightly alkaline pH (pH 8.3) and high ionic strength (0.5 M) the strong interactions between the hydrophobic regions of the proteins delimit a protected domain in both sequences inaccessible to proteolytic cleavage by trypsin or related enzymes.

The fractionation of the limited enzymatic digest on Bio-Gel P10 allowed us to isolate a large fragment of histone H2A (RP-1 H2A, residues 35–124) together with a large peptide of histone H2B (RP-1 H2B, residues 24–125) (Fig. 6).

Purification of RP-1 H2A was achieved by gel filtration chromatography on Sephadex G-100 SF. Its amino acid composition (Table 1) is consistent with that of a fragment of 90 residues corresponding to the C-terminal three-quarters of the protein. 23 steps of automated Edman degradation were performed and gave us the necessary overlaps to determine the complete amino acid sequence of starfish histone H2A (Fig. 7).

DISCUSSION

The amino acid sequence of starfish gonad histone H2A (124 residues) presents, by comparison with that of calf homologous histone, twelve substitutions and five deletions (Table 5). Five deletions and four substitutions occur in the N-terminal and C-terminal basic regions: two substitutions and one deletion are observed in the sequence 1–19; two substitutions and four deletions are observed in the sequence 118–124. The deletion of the glutamine residue at position 6 leads to a total identity between the N-terminal sequences of histones H2A and H4. The substitution at position 19 (Ser → Ala) results in the loss of a phosphorylation site [22]. This phosphorylation site is also lost in the variants of *Triticum* H2A [7], where serine is replaced by isoleucine or valine. Loss of a phosphorylation site involves the intervention of other process of regulation of the DNA-histone interactions in the nucleosome. The acetylation might very well be this other process since, in addition to the lysine residue at position 5, the lysine residue at position 8 can be acetylated.

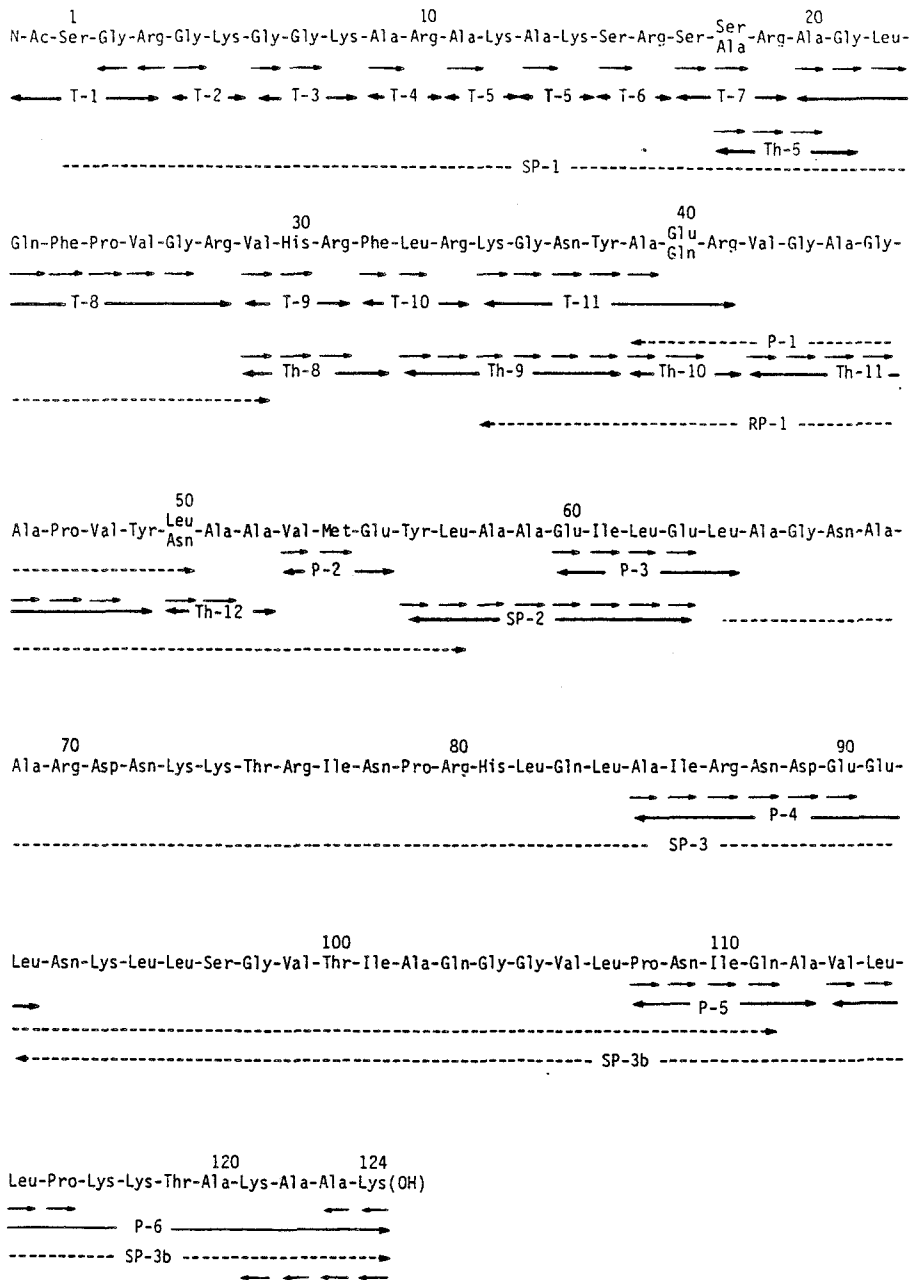


Fig. 7. Alignment of peptides and amino acid sequence of starfish histone H2A. Methods used for determination of the sequence of peptides are indicated as follows: → manual Edman degradation; ← carboxypeptidase hydrolysis; ---- automated Edman degradation

Table 5. Comparison of the sequences of histone H2A from two echinoderms (starfish and sea-urchin) and from calf

Species	Residues at position						
	6	11	16	20	33	41	51
Calf thymus [2]	Gln-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg		Thr-Arg-Ser-Ser-Arg		Leu	Glu	Leu
Starfish gonads	—		Ser -	Ser/Ala	Phe	Glu/Gln	Leu/Asn
Sea-urchin gonads [5]	— -Ala-	Gly-Lys	Ser -		Phe	Asn	Leu
Calf thymus	55 Leu	59 Thr	79 Ile	98 99 Gly-Lys/Arg	121 Glu-Ser	-His-His-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys(OH)	129
Starfish gonads	Met	Ala	Asn	Ser-Gly	— Ala —	— Lys-Ala —	Ala-Lys(OH) 124
Sea-urchin gonads		Ala	Ile	Gly	Gly-Ser	— Lys-Ser —	Ser-Lys(OH) 125

Deletions are indicated by —. Numbering in this table and in the text refers to sequence positions in calf thymus histone H2A.

The deletion of the two histidine residues (at positions 123 and 124 in the calf histone) is a feature of fish [23] and invertebrate H2A [5, 6, 24].

Eight substitutions occur in the central region (residues 20–117), which strongly interacts with histone H2B to form the dimer H2A-H2B. Four of them are non-conservative and involve either the replacement of a polar charged residue by a neutral polar residue (Glu⁴¹ → Gln⁴⁰; Lys⁹⁹ → Gly⁹⁸) or the replacement of a bulky hydrophobic residue by a neutral polar residue (Leu⁵¹ → Asn⁵⁰; Ile⁷⁹ → Asn⁷⁸). These changes at positions 51 and 79 have never been observed up to now and could be associated with structural modifications in the hydrophobic region of histone H2B, which interacts with histone H2A (A. Martinage, unpublished results).

The substitution at position 33 (Leu → Phe) is characteristic of histone H2A from echinoderms [5, 24]. Obviously this substitution is conservative but also it brings up a potentiality of interaction with other aromatic residues and, again, this could be related with some specific feature of the primary structure of histone H2B. Indeed, when the starfish H2A-H2B dimer is submitted to a limited hydrolysis with Arg-C endoprotease, the histone fragments obtained are different in length from those obtained in similar conditions from the calf H2A-H2B complex. The starfish dimer yields essentially the peptides 35–124 from H2A and 24–125 from H2B, whereas the calf dimer yields mainly the peptides 18–129 from H2A and 32–125 from H2B.

The change Leu → Met at position 54 has already been found in cuttlefish histone H2A [6]; but more frequently this change occurs at position 51 as observed in H2A from mouse ascite tumor cells [25], mouse Friend leukemia cells [26] and sea-urchin embryos [27].

The presence of two amino acid residues at positions 18, 40 and 50 reflects the existence of at least two H2A variants in starfish gonads. From the data provided by pepsin peptides P-1a and P-1b (Table 4) the glutamate and glutamine at position 40 are associated with asparagine and leucine, respectively, at position 50. The functional significance of these variants remains unclear.

The data concerning the automated Edman degradation of peptides are available from the authors upon request.

The authors are grateful to Dr A. Richard (Station Marine, 62930 Wimereux, France) who provided the starfish gonads, and to Dr C. Crane-Robinson who performed the NMR spectrum of the amino-terminal tripeptide. They acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of M. J. Dupire, T. Ernout and A. Hémez. They thank also Dr G. Briand and O. Hannedouche from the *Service commun de Séquence U. 16/U. 124 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Lille) for the sequencer runs. This work was supported by grant 77.5.048.2 from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* and grants from the *Centre National de la Recherche Scientifique (ATP Chromatine 4203 and L.A. 268)*.

REFERENCES

1. Sautière, P., Tyrrou, D., Laine, B., Mizon, J., Lambelin-Breynaert, M. D., Ruffin, P. & Biserte, G. (1972) *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 274, 1422–1425.
2. Sautière, P., Tyrrou, D., Laine, B., Mizon, J., Ruffin, P. & Biserte, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 41, 563–576.
3. Laine, B., Sautière, P. & Biserte, G. (1976) *Biochemistry*, 15, 1640–1645.
4. Laine, B., Kmićik, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1978) *Biochimie (Paris)* 60, 147–150.
5. Wouters, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 231–239.
6. Wouters-Tyrrou, D., Martin-Ponthieu, A., Briand, G., Sautière, P. & Biserte, G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 489–498.
7. Von Holt, C., Strickland, W. N., Brandt, W. F. & Strickland, M. S. (1979) *FEBS Lett.* 100, 201–218.
8. Strickland, M., Strickland, W. N., Brandt, W. F. & Von Holt, C. (1974) *FEBS Lett.* 40, 346–348.
9. Johns, E. W. (1967) *Biochem. J.* 105, 611–614.
10. Johns, E. W. (1964) *Biochem. J.* 92, 55–59.
11. Skandrani, E., Mizon, J., Sautière, P. & Biserte, G. (1972) *Biochimie (Paris)* 54, 1267–1272.
12. Panyim, S., Bilek, D. & Chalkley, R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4206–4215.
13. Panyim, S. & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337–346.
14. Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 222–226.
15. Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., ed.) 2nd edn, pp. 232–279, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
16. Tarr, G. E., Beecher, J. F., Bell, M. & McKeaw, D. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 622–627.
17. Klapper, D. G., Wilde, C. E. & Capra, J. D. (1978) *Anal. Biochem.* 85, 126–131.
18. Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Neurath, H. & Walsh, K. A. (1978) *Biochemistry*, 17, 5672–5679.
19. Pisano, J. J. & Bronzert, T. J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5597–5607.
20. Vanhoutte-Durand, G., Mizon, J., Sautière, P. & Biserte, G. (1977) *Comp. Biochem. Physiol.* 57B, 121–126.
21. Wouters, D., Martin-Ponthieu, A., Sautière, P. & Biserte, G. (1981) *FEBS Lett.* 128, 195–200.
22. Martinage, A., Mangeat, P., Laine, B., Couppez, M., Sautière, P., Marchis-Mouren, G. & Biserte, G. (1980) *FEBS Lett.* 118, 323–329.
23. Bailey, G. S. & Dixon, G. H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 5463–5472.
24. Strickland, W. N., Strickland, M. S., De Groot, P. C. & Von Holt, C. (1980) *Eur. J. Biochem.* 109, 151–158.
25. Franklin, S. G. & Zweidler, A. (1977) *Nature (Lond.)* 266, 273–275.
26. Blankstein, L. A., Stollar, B. D., Franklin, S. G., Zweidler, A. & Levy, S. B. (1977) *Biochemistry*, 16, 4557–4562.
27. Schaffner, W., Kunz, G., Daetwyler, H., Telford, J., Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1978) *Cell*, 14, 655–671.

A. Martinage, D. Bélaiche, T. Dupressoir, and P. Sautière,

Groupe de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur les Cellules Normales et Cancéreuses

(Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Institut de Recherches sur le Cancer, Cité Hospitalière,

2 Place de Verdun, F-59020 Lille-Cedex, Nord, France

Primary structure of histone H2B from gonads of the starfish *Asterias rubens*.

Arlette MARTINAGE, Gilbert BRIAND, Alain VAN DORSSELAER,
Colyn CRANE-ROBINSON and Pierre SAUTIERE

Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Lille ; Institut de Neurochimie, Strasbourg and Portsmouth Polytechnic Biophysics Laboratories, Portsmouth

In preparation for European Journal of Biochemistry
Subdivision : Protein Chemistry and Structure.

SUMMARY

The complete amino acid sequence (121 residues) of histone H2B from gonads of the starfish *Asterias rubens* has been established from structural data obtained essentially from large fragments generated by cleavage of histone H2B at aspartyl residues and by limited hydrolysis of the dimer H2A-H2B with mouse submaxillary gland protease.

No real sequence homology can be found between the amino-terminal sequence (residues 1-21) of starfish and calf H2B. One substitution not conservative (serine 32 in calf → lysine 28 in starfish) leads to the presence of a cluster of eight basic residues (sequence 23-30) and to the disappearance of a potential site of phosphorylation.

A particular structural feature of starfish histone H2B is the presence of N-dimethylproline at its amino-terminal end. By comparison with N-terminal acetylation which is commonly found in histones the N-terminal methylation is rarely observed. At the present time, the functional significance of the N-terminal methylation as well as that of the proline-rich nature of the amino-terminal sequence of the starfish histone H2B remain to be defined.

INTRODUCTION

The amino acid sequences of core particle histones were first determined for calf thymus, then in a variety of tissues and species [1]. While histones H3 and H4 show a remarkable structural stability throughout the evolution [2, 3], histones H2A and H2B appear more variable.

Structural studies of histone H2A from Vertebrates : calf [4], rat [5], chicken [6] and from marine invertebrates [7-10] show that most of the structural changes (point mutations, deletions) occur mainly in the highly basic amino-terminal and carboxy-terminal parts of the protein.

Similarly, the structural variations of histone H2B have been studied among Vertebrates [11-15], marine invertebrates [16-20] and protozoa (*Tetrahymena*) [21].

The peculiar structural characteristics and the higher degree of variability observed in histone H2B from Echinidae [1] have led us to investigate the primary structure of histone H2B in Asterinidae, another family of the phylum Echinoderms.

In this paper, we report the complete amino acid sequence of histone H2B from gonads of the starfish *Asterias rubens*. This sequence was established from structural data provided by tryptic peptides and large fragments derived from cleavage of the protein at aspartic acid and arginine residues.

Starfish histone H2B is devoid of a free amino-terminal group. The blocking group has been identified as dimethylproline. The amino-terminal blocking of histones by methylation has only been observed previously in *Tetrahymena* histone H2B [22].

MATERIALS AND METHODS

Materials

Mature starfish were obtained from the Station Marine, Wimereux (France). After excision, gonads were frozen in solid CO₂ and kept at - 20°C until use.

Trypsin (treated with TosPheCH₂Cl), carboxypeptidases A and B (treated with PhMeSO₂F) were obtained from Worthington. Thermolysin was from Merck. Arg-C endoproteinase from submaxillaris gland of mouse was purchased from Boehringer.

Dimethylallylamine, propane-1-ol and dithioerythritol were sequanal grade from Pierce. Benzene and chloro-1-butane for sequential analysis were purchased from SDS (Peypin, France). Phenylisothiocyanate, heptane and heptafluorobutyric acid were sequanal grade from Merck. Polybrene was purchased from Aldrich and the dipeptide Gly-Gly from Sigma. All other reagents were of the highest purity available.

Isolation of Histone H2B and of Histone Dimer H2A-H2B

Chromatin was isolated from gonads as described in [23]. The crude fraction F2b was extracted from chromatin by method 2 of Johns [24]. This fraction contained histone H2B but also histones H3 and H2A. Highly purified histone H2B

was isolated by preparative electrophoresis at pH 3.2 in 6.25 M urea [25]. Alternatively, fraction F2b was depleted of histone H2A by acetic selective precipitation (A. Martinage, unpublished results) and fractionated by chromatography on a Biogel P10 column (150 x 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

The dimer H2A-H2B was obtained from fraction F2b by ion exchange chromatography on Biorex 70 [9].

Purity of histone H2B and of complex H2A-H2B was assessed by analytical gel electrophoresis at pH 3.2 in 6.25 M urea according to Panyim and Chalkley [26] using a 17 % acrylamide concentration.

Amino acid analyses of histone samples were performed on a Beckman 119 CL amino acid analyser after hydrolysis in 6 M HCl (1 ml/mg of protein) in vacuum at 110°C for 24 h and 72 h with one drop of 1 % phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Structural Studies

Carboxy-terminal Analysis. Histone H2B (1 mg, 70 nmol) was dissolved in 1 ml of 0.2 M N-methylmorpholine acetate, pH 8.0 and digested at 40°C with carboxypeptidase B (40 µg). At 60 min, aliquot was taken off, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. Carboxypeptidase A (15 µg) was then added. Aliquots were taken off at 30 min, 60 min and 120 min and treated as above. The released amino acids were analysed on the amino acid analyser.

Cleavage at Aspartyl Residues. Histone H2B (80 mg, 6 μ mol) was hydrolysed with 0.25 M acetic acid (1 ml/10 mg of protein) in an evacuated sealed tube at 105°C for 16 h. The hydrolysate was freeze-dried prior to fractionation.

Enzymatic Hydrolyses. Histone H2B (10 mg, 700 nmol) was hydrolysed with TosPheCH₂Cl-trypsin in 0.1 M N-methylmorpholine acetate at pH 8.0 and 37°C for 2 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w). The dimer H2A-H2B (50 mg, 4 μ mol) was submitted to a limited hydrolysis with Arg-C endoproteinase in 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.3, containing 0.5 M NaCl at room temperature for 5 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:5000 (w/w). The enzymatic hydrolysates were freeze-dried and submitted to fractionation.

Fractionation of Peptides. The peptides obtained by cleavage of starfish histone H2B at aspartyl residues were separated by chromatography on a Sephadex G-50 F column (150 x 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Further purification was achieved either by gel-filtration chromatography on a Sephadex G-100 SF column (90 x 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 N HCl saturated with chloroform or by reverse high pressure liquid chromatography using a Waters Associates ALC/GPC 244 apparatus equipped with a U6K sample injector and a Cecil 212 variable wavelength ultraviolet monitor. The peptide samples were loaded onto a C18 μ Bondapak column (9 μ m, 0.39 x 30 cm) equilibrated with 0.05 % trifluoroacetic acid. Peptides were eluted with a linear gradient

(Waters solvent programm 6) of acetonitrile (0-30 %) in 0.05 % trifluoroacetic acid for 30 min. The histone fragments generated by hydrolysis of the dimer H2A-H2B with Arg-C endoproteinase, were separated by chromatography on a Biogel P10 column (150 x 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform [9]. Tryptic peptides of histone H2B were separated by reverse-phase high pressure liquid chromatography. Peptides were eluted with a gradient (Waters solvent programm 7) of acetonitrile (0-40 %) in 0.05 % trifluoroacetic acid for 40 min.

Sequence of Peptides

Small peptides were sequenced by manual Edman degradation [27] and large peptides by automated Edman degradation using a Beckman 890 C sequencer with a dimethylallylamine programm (102974) in the presence of polybrene [28, 29]. Identification and quantification of phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were performed as described in [30].

Nomenclature of Peptides

Peptides generated by cleavage of the protein at aspartyl residues were designated Ac-. Tryptic peptides were designated T-. Peptides obtained by limited hydrolysis of the H2A-H2B with the Arg-C endoproteinase were designated RP-. Peptides were numbered according to their position in the amino acid sequence of the protein.

RESULTS

Crude fraction F2b from starfish gonad chromatin contains essentially histone H2B contaminated by histones H2A, H3 and by a number of proteins of slower mobility as shown on polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 1, slot 2). Pure histone H2B was obtained from this fraction either by preparative gel electrophoresis or by Biogel P10 chromatography (Fig. 1, slot 3). Upon ion-exchange chromatography of fraction F2b on Biorex-70 [9], the starfish histone dimer H2A-H2B was eluted free of contamination at 11 % guanidinium chloride concentration (Fig. 1, slot 4). This complex was used to generate by limited proteolytic hydrolysis large fragments of histones H2A and H2B without prior isolation of individual histones.

Table 1 shows the amino acid composition of starfish histone H2B. By comparison with calf homologous histone, the starfish H2B is mainly characterized by the presence of three methionine residues and a lower content of serine; moreover, a decreased lysine content balanced by an increased arginine content has to be mentioned.

Starfish histone H2B was found lacking a free amino-terminal group as established by dansylation [31] and Edman degradation [27]. The identification of the blocking group was performed on the amino-terminal tryptic peptide T-1. The amino acid composition of T-1 shown in table 2, was also determined by gas chromatography. In this case, the amino acids were derived by treatment with propanol-6 M HCl during 20 min at 130°C followed by treatment with heptafluorobutyric anhydride during 15 min at 130°C. Derived

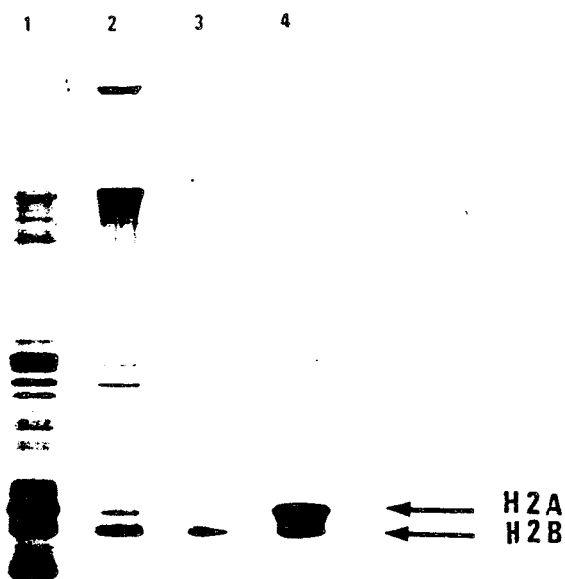


Fig. 1. Electrophoretic analysis of fractions obtained after preparative electrophoresis on polyacrylamide slab gel and after chromatography on Biorex-70 of crude fraction F2b from starfish gonad chromatin. Electrophoresis was performed at 22 mA for 3 h at pH 3.2 in 6.25 M urea (26). Migration was from top to bottom. Gel was stained for 60 min with 0.5% Coomassie Blue R in acetic acid/ethanol/water (1:2:7, by vol.) and destained by diffusion in the mixture acetic acid/ethanol/water (7:20:73, by vol.). Slot 1 : whole histone from starfish gonad ; slot 2 : crude histone fraction F2b ; slot 3 : H2B obtained after preparative electrophoresis ; slot 4 : dimer H2A-H2B obtained by ion-exchange chromatography on Biorex-70.

Table 1. Amino acid composition of starfish histone H2B and of peptides used for the sequence determination

Results are expressed as the number of residues/mol protein or peptide. Values in parentheses are residues/mol derived from the final sequence. Values for threonine and serine in the protein are zero-time extrapolation.

	H2B Calf [11]	H2B Starfish	AC-1 Residues 1-21	AC-2 Residues 23-47	AC-3 Residues 48-63	AC-4 Residues 65-121	AC-4a Residues 111-121	RP-1 Residues 1-20	RP-2 Residues 21-121
Asp	6	6.6 (6)	0.3 (0)	0.6 (1)	1.2 (2)	1.4 (1)			6.2 (6)
Thr	8	9.1 (9)	0.7 (1)		0.9 (1)	6.8 (7)	2.8 (4)		7.2 (9)
Ser	14	11.0 (11)	0.9 (1)	1.2 (1)	3.2 (4)	5.2 (5)	2.1 (1)	1.0 (1)	8.0 (10)
Glu	10	9.4 (9)	1.1 (1)	2.1 (2)	0.9 (0)	6.4 (6)		1.3 (1)	8.8 (8)
Pro ^{**}	6	5.1 (5)	2.8 (3)	0.9 (1)		1.1 (1)		2.1 (3)	2.6 (2)
Gly	7	8.5 (8)	4.1 (4)	1.3 (1)	1.2 (1)	2.5 (2)		3.1 (4)	6.0 (4)
Ala	13	12.3 (12)	3.2 (3)		1.9 (1)	8.0 (8)	1.1 (1)	3.1 (3)	10.9 (9)
Val	9	7.1 (7)		1.9 (2)	1.0 (1)	3.8 (4)	1.0 (1)		6.8 (7)
Met	2	2.8 (3)		0.7 (1)	1.3 (2)				2.6 (3)
Ile	6	7.0 (7)		1.7 (2)	2.1 (2)	2.2 (3)			6.0 (7)
Leu	6	5.5 (5)				4.5 (5)			5.7 (5)
Tyr	5	4.8 (5)		2.2 (3)		2.0 (2)	0.7 (1)		4.7 (5)
Phe	2	2.0 (2)			0.9 (1)	0.9 (1)			1.7 (2)
His	3	3.0 (3)		0.7 (1)		2.0 (2)			2.4 (3)
Lys	20	17.4 (18)	6.0 (6)	5.4 (6)		5.4 (6)	3.0 (3)	5.2 (6)	12.2 (12)
Arg	8	11.0 (10)	1.0 (1)	4.0 (4)	1.4 (1)	3.8 (4)		1.0 (1)	9.0 (9)
Total Residues	125	121	21	25	16	57	11	20	101

^{**}Dimethylproline is not detected upon amino acid analysis and therefore does not appear in amino acid composition. However, the number of residues in protein and in amino-terminal peptides takes into account the presence of this substituted amino acid.

Table 2. Amino acid composition of chemoenzymic and enzymic peptides used to elucidate starfish histone H2B sequence

Amino acids	Th-1 ^a 1-11	Th-2 12-21	T-1 ^{a,b} 1-7	T-2 8-11	T-3 11-14	T-4 15-16	T-5 17-20	T-6 21-23	T-7 31-39	T-8 40-42	T-9 43-53	T-10 54-68	T-11 69-75	T-12 76-82	T-13 83-88	T-14 89-95	T-15 96-104	T-16 105-112	T-17 113-116	T-18 117-121	
Aspartic acid					1.1 (1)			1.0 (1)			1.0 (1)			1.0 (1)							
Threonine		0.9 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)						1.0 (1)				1.9 (2)	1.2 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)	
Serine	1.2 (1)		1.0 (1)						0.9 (1)		1.0 (1)				2.2 (2)			1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	
Glutamic acid	1.0 (1)			1.1 (1)					1.1 (1)		1.0 (1)					2.2 (2)	1.2 (1)	1.0 (1)			
Proline	2.0 (2)	1.0 (1)	1.8 (2)				0.8 (1)				0.9 (1)						1.0 (1)				
Glycine	2.2 (2)	2.0 (2)	1.0 (1)	1.2 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)		1.2 (1)		1.1 (1)					1.4 (1)	1.2 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	
Alanine		2.6 (3)			1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)				1.1 (1)					2.0 (2)				1.0 (1)	
Valine										1.1 (1)	0.8 (1)										
Methionine									1.3 (2) ^c	0.9 (1)	0.9 (1)	1.9 (2)	1.0 (1)		0.9 (1)						
Isoleucine												1.2 (2)									
Leucine											0.9 (1)									3.8 (4)	
Tyrosine									1.7 (3) ^c												
Phenylalanine												1.9 (2)									
Histidine											0.9 (1)									0.8 (1)	
Lysine	4.0 (4)	2.2 (2)	1.8 (2)	1.7 (2)	1.7 (2)	1.4 (1)		1.0 (1)	0.8 (1)	1.0 (1)				0.9 (1)			1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	
Arginine		1.0 (1)					1.0 (1)				0.9 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)					

^a Dimethylproline is not detected upon amino acid analysis and therefore does not appear in amino acid composition. However the number of residues in amino-terminal peptides takes into account the presence of this substituted amino acid.

^b The amino acid analysis of peptide T-1 was performed on a 24 h-hydrolyzate both by liquid chromatography and by gas chromatography after derivatization of amino acids with heptafluorobutyric anhydride and propenol.

^c Values deduced from the sequence.



amino acids were analysed by gas chromatography on a Carlo Erba gas chromatograph with a capillary column SE 30. The results were identical to those obtained by liquid chromatography, i.e., Ser₁, Pro₂, Gly₁, Lys₂. As gas chromatography allows the detection of all uncharged amino acids even without free amino-terminal end and as no additional amino acid was evidenced by this method, the presence of a charged amino acid at the amino-terminus of peptide T-1 was therefore strongly suspected.

The molecular weight of peptide T-1 was determined as m/z 738 by fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry (Fig.2). This value of m/z 738 is only consistent with the presence of a N-dimethylproline residue at the amino-terminal end of the peptide T-1. Moreover, study of the mass listing from the spectrum showed the presence of a unique ion with a double charge $[M + H]^{2+}$, which appears with an half-mass of 369.6. This confirms the molecular mass of 738 for the charged peptide, of which the amino acid composition is therefore : dimethyl Pro₁, Ser₁, Pro₂, Gly₁, Lys₂.

The peptide T-1 was then depleted of the carboxy-terminal lysine residue by carboxypeptidase B digestion. The resulting hexapeptide was purified by high pressure liquid chromatography and analysed by high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy with a Bruker 270.Mhz Fourier transform spectrometer. Spectra were obtained at pH 3.0 and pH 10.5 in ²H₂O (Fig.3).

In the pH 3 spectrum (Fig.3,A), integration of the area between 3.6 and 4.0 δ indicates a total of 8 protons

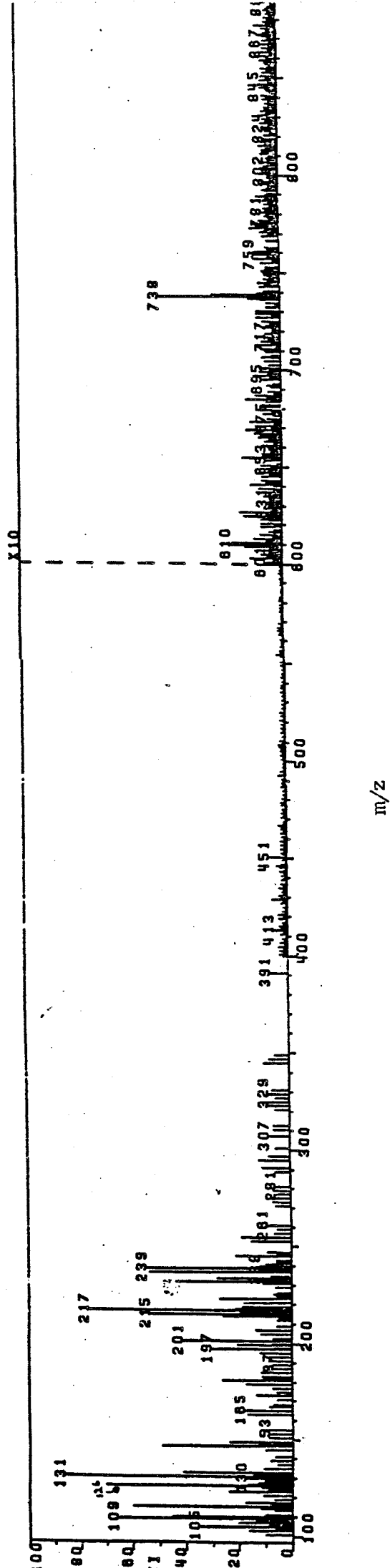


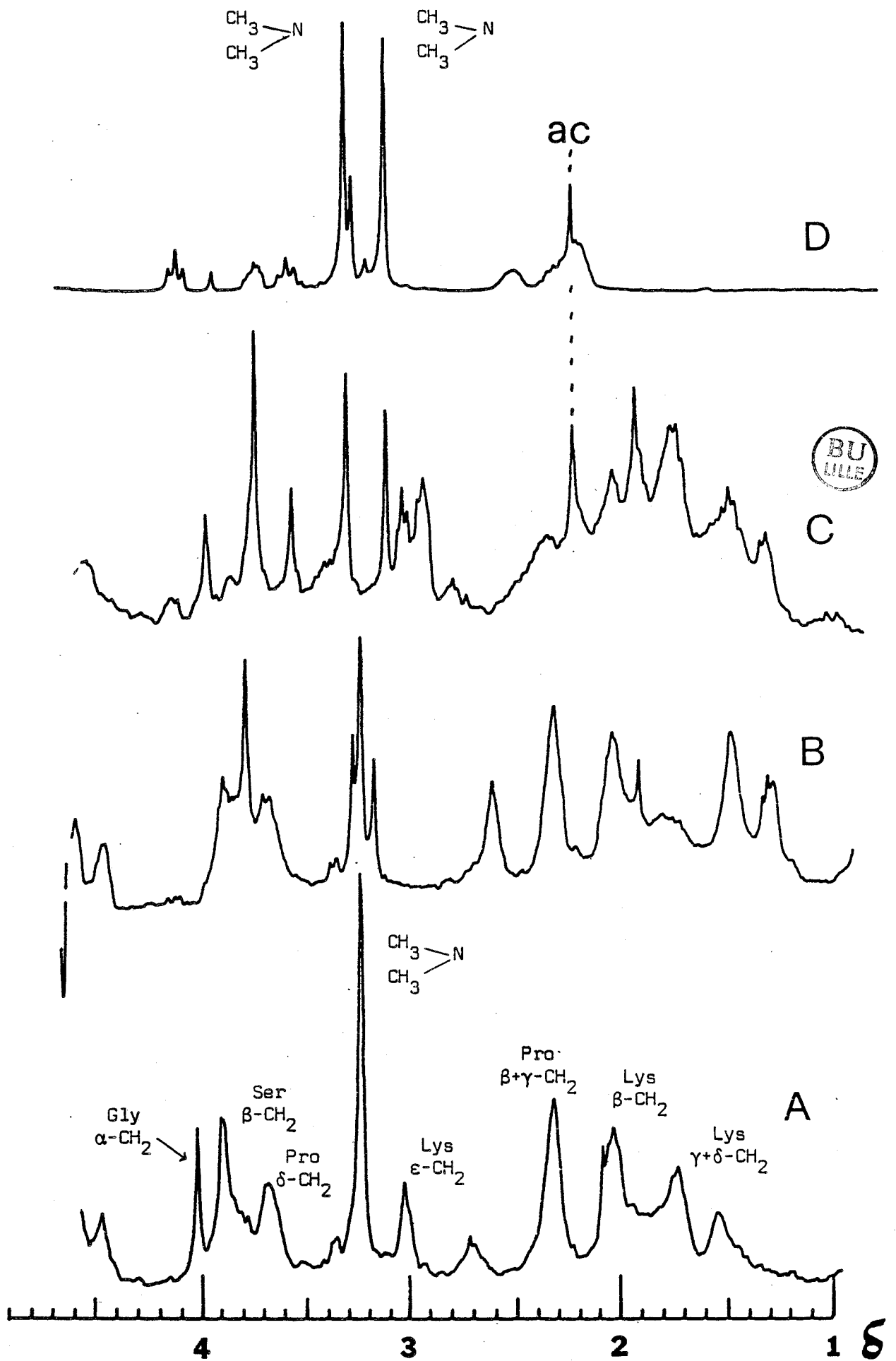
Fig. 2. The fast atom bombardment mass spectrum of peptide T-1 using Xenon fast atoms at 8 kV, with a VG ZAB apparatus.



Fig. 3. 270 MHz proton NMR spectra of :

- A N-terminal hexapeptide at pH 3 in D₂O
- B N-terminal hexapeptide at pH 10.5 in D₂O
- C Hydrolysate of the hexapeptide at pH 7 in D₂O (10 mM phosphate)
- D Stachydrine at pH 7 in D₂O (10 mM phosphate)

Chemical shifts are referenced to internal standards of acetone (ac, at 2.23 δ) and the ϵ -CH₂ of lysine (3.03 δ).



when referenced to the two proton ϵ -CH₂ lysine triplet at 3.03 δ . Two of these eight correspond to the serine β -CH₂. This leaves six protons, indicating three proline residues. The peak areas and shifts therefore indicate a composition Pro₃, Lys₁, Ser₁, Gly₁. In addition there is a singlet at 3.25 δ in the pH 3 spectrum which integrates as six protons, the chemical shift being typical of quaternary amino methyls. This peak remains at the same chemical shift between pH 3 and pH 9, (data not shown) which is also consistent with a quaternary amino group. At pH 10.5 it becomes complex (Fig.3,B) but with no movement of the central peak at 3.25 δ . This peak might represent the two methyls of N-dimethylproline, which as the free amino acid (stachydrine) shows characteristically different chemical shifts for the two structurally non-equivalent methyls (3.12 δ and 3.31 δ at pH 7) (Fig.3,D). Since a conformational peculiarity of the sequence must be responsible for the pseudo-equivalence of the two methyl groups in the intact peptide, the hexapeptide was subsequently hydrolysed in 6M HCl for 24 hours at 110°C. The hydrolysate was lyophilised and redissolved in ²H₂O at pH 7.0. The dimethylsinglet at 3.25 δ was replaced by two singlets at 3.12 and 3.31 δ (Fig. 3,C), corresponding exactly to those of free dimethylproline (stachydrine) (Fig.3,D). The partial sequence of peptide T-1 was established as di-CH₃-Pro-(Pro₂, Lys)-Ser-Gly-Lys from data provided by digestion of the peptide with carboxypeptidase B followed by either carboxypeptidase A digestion or hydrazinolysis of the residual peptide.

The carboxy-terminal sequence of starfish histone H2B was established as Tyr-Thr-Thr-Ser-Lys(OH) from data provided by hydrolysis of the protein with carboxypeptidases B and A and structural study of the carboxy-terminal tryptic peptide T-18 (Table 2, fig. 7).

With the methodology of automated sequencing the strategy used to elucidate the primary structure of starfish histone H2B was first intended to produce a minimum of large adjacent or overlapping fragments by highly specific chemical cleavage or by limited enzymatic hydrolysis of the dimer H2A-H2B. In the second place, histone H2B was hydrolysed with trypsin to obtain small peptides which were used to confirm the structural data provided by the automated Edman degradation of the large fragments and to obtain the necessary overlaps to determine the complete amino acid sequence of starfish histone H2B (Fig. 7).

Acetic Peptides from the Native Protein

Thus, starfish histone H2B was first cleaved at aspartyl residues with 0.25 M acetic acid as shown in Fig. 4. Seven peptides were obtained which were separated on Sephadex G-50 F (Fig. 5) and further purified on Sephadex G-100 SF or by reverse-phase high pressure liquid chromatography. The amino acid compositions of peptides used to elucidate the sequence are given in table 1.

The amino-terminal fragment Ac-1 (1-21) was further hydrolysed with thermolysin in 0.1 M N-methylmorpholine acetate at pH 8.0 and 40°C for 2 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50. Upon fractionation of the hydrolysate

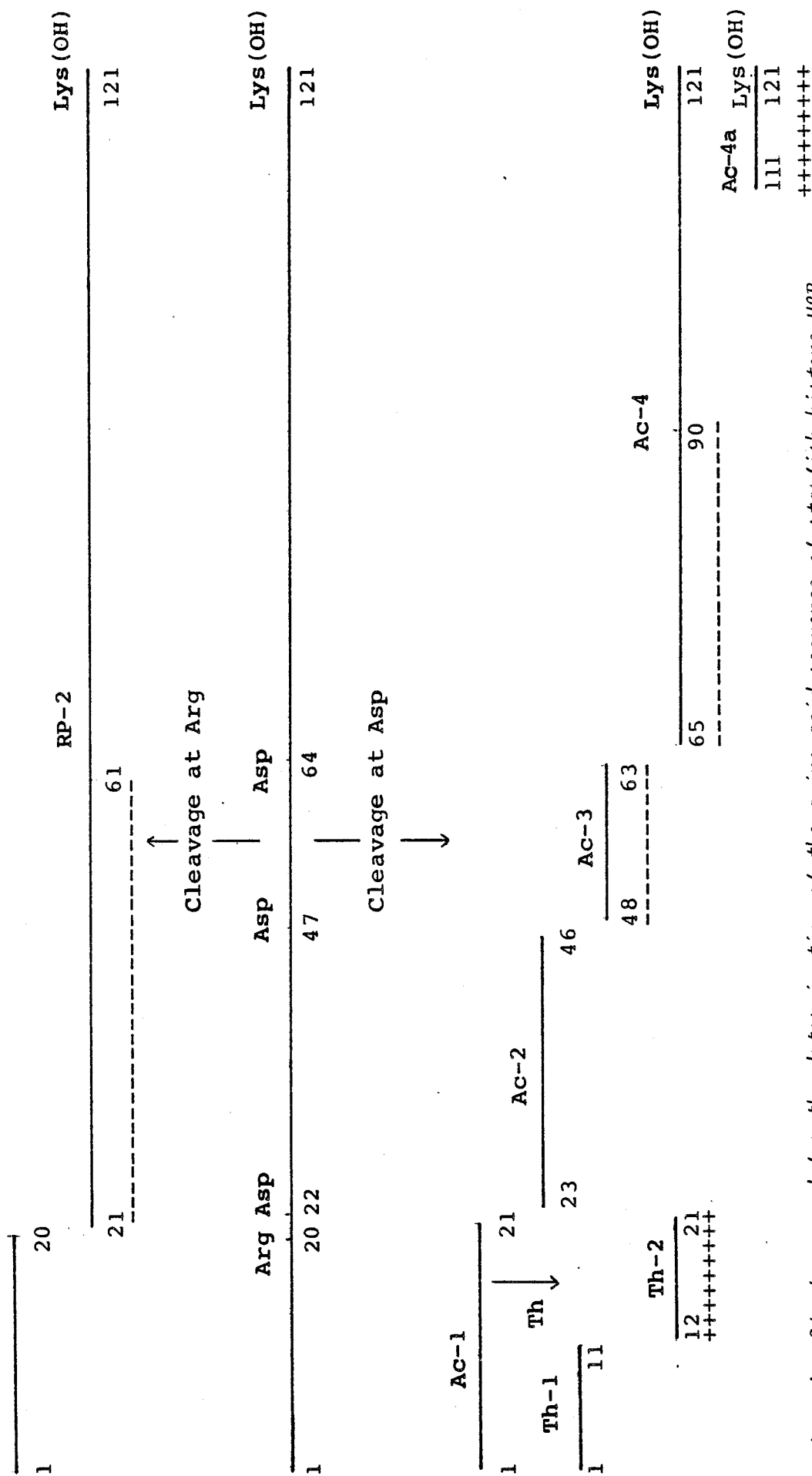
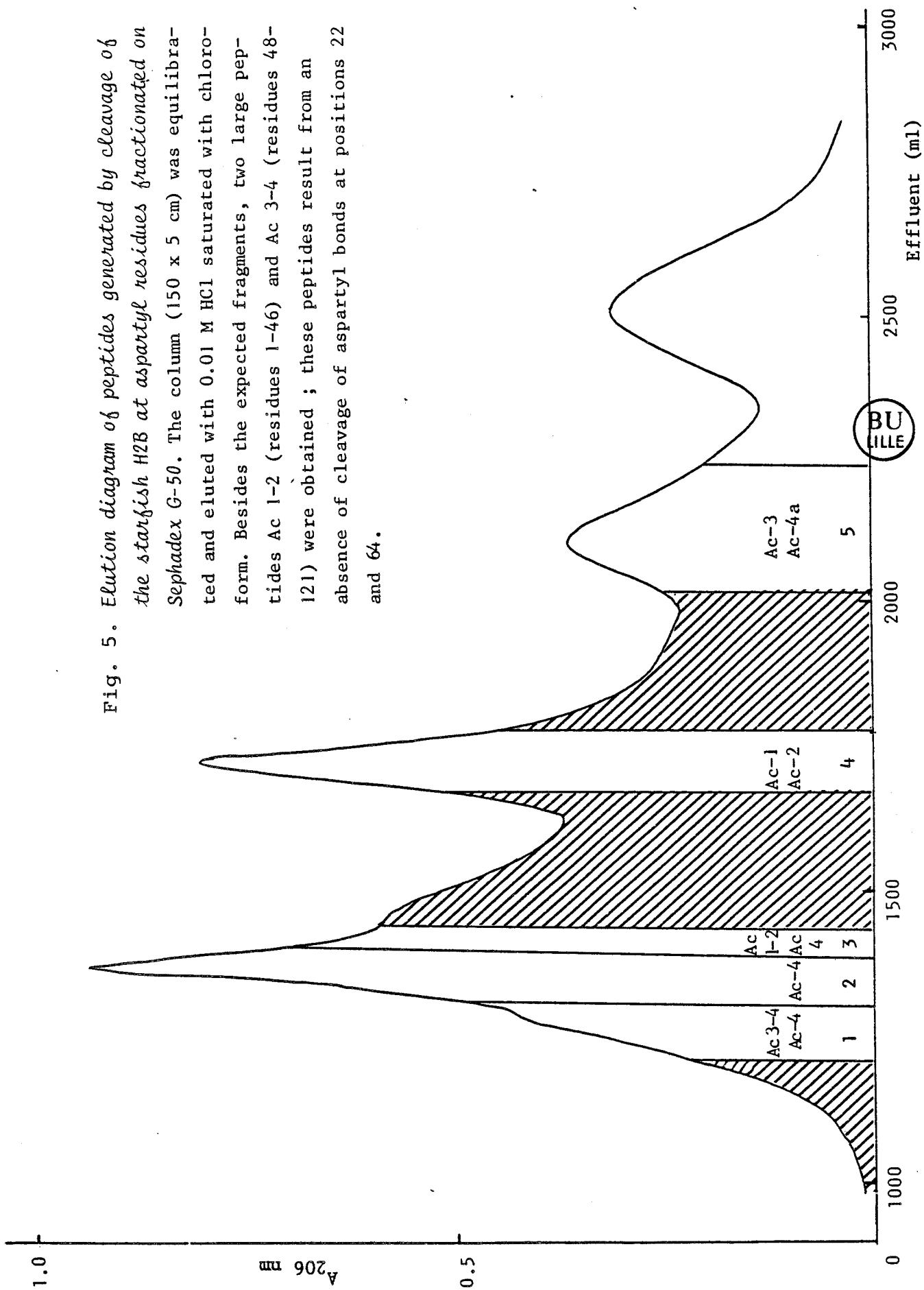


Fig. 4. Strategy used for the determination of the amino acid sequence of starfish histone H2B. RP, Arg-C endoproteinase peptides (cleavage at Arg); Ac, acetic peptides (cleavage at Asp); Th-, thermolysin peptides. The tryptic peptides generated from the native protein are not included in the scheme. (----) Automated Edman degradation; (++++) manual Edman degradation.



Fig. 5. Elution diagram of peptides generated by cleavage of the starfish H2B at aspartyl residues fractionated on Sephadex G-50. The column (150 x 5 cm) was equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Besides the expected fragments, two large peptides Ac 1-2 (residues 1-46) and Ac 3-4 (residues 48-121) were obtained; these peptides result from an absence of cleavage of aspartyl bonds at positions 22 and 64.



by ion-exchange chromatography on Chromobeads P (Technicon Corporation) [7], two large peptides, Th-1 [1-11] and Th-2 [12-21], were obtained (Fig. 4 and 7 and Table 2) together with smaller peptides not used in the course of sequence determination.

The carboxy-terminal sequence of Th-1 was determined as Lys-Lys(OH) following a 3 h-digestion with carboxypeptidase B. Th-1 (120 nmol) was then hydrolysed with 12 μ g of TosPheCH₂Cl-trypsin in 0.1 M N-methylmorpholine acetate at pH 8.0 and 37°C for 24 h.

The two tryptic peptides derived from Th-1 (Fig. 7) were separated by reverse-phase high pressure liquid chromatography and were found to be identical to peptides T-1 and T-2 obtained from a 2 h tryptic digest of the native protein (Table 2).

The fragment Ac-2 (23-46) which overlaps the amino-terminal sequence of the fragment RP-2 (Fig. 4) was not studied further. The fragment Ac-3 (48-63) was entirely sequenced by automated Edman degradation. The fragment Ac-4 (65-121) was submitted successfully to automated sequencing over 25 cycles.

The peptide Ac-4a (111-121) arises from a non-specific cleavage of the Gly-Thr bond by 0.25 M acetic acid. Its sequence was established from data provided by manual Edman degradation and carboxypeptidases B and A digestion (Fig. 7).

Arg-C Endoproteinase Digestion of the Dimer H2A-H2B

The limited hydrolysis of the dimer H2A-H2B with the Arg-C endoproteinase yielded two large fragments RP-1 (1-20)

and RP-2 (21-121) which were separated on Biogel P10 as in [9]. Their amino acid composition are presented in Table 1.

The fragment RP-1 which differs only by one residue of fragment Ac-1 (Fig. 4 and 7) was not studied further.

The fragment RP-2 was submitted successfully to 42 cycles of automated Edman degradation. Thus, structural data obtained from this fragment allowed us to align the acetic fragments Ac-1, Ac-2 and Ac-3.

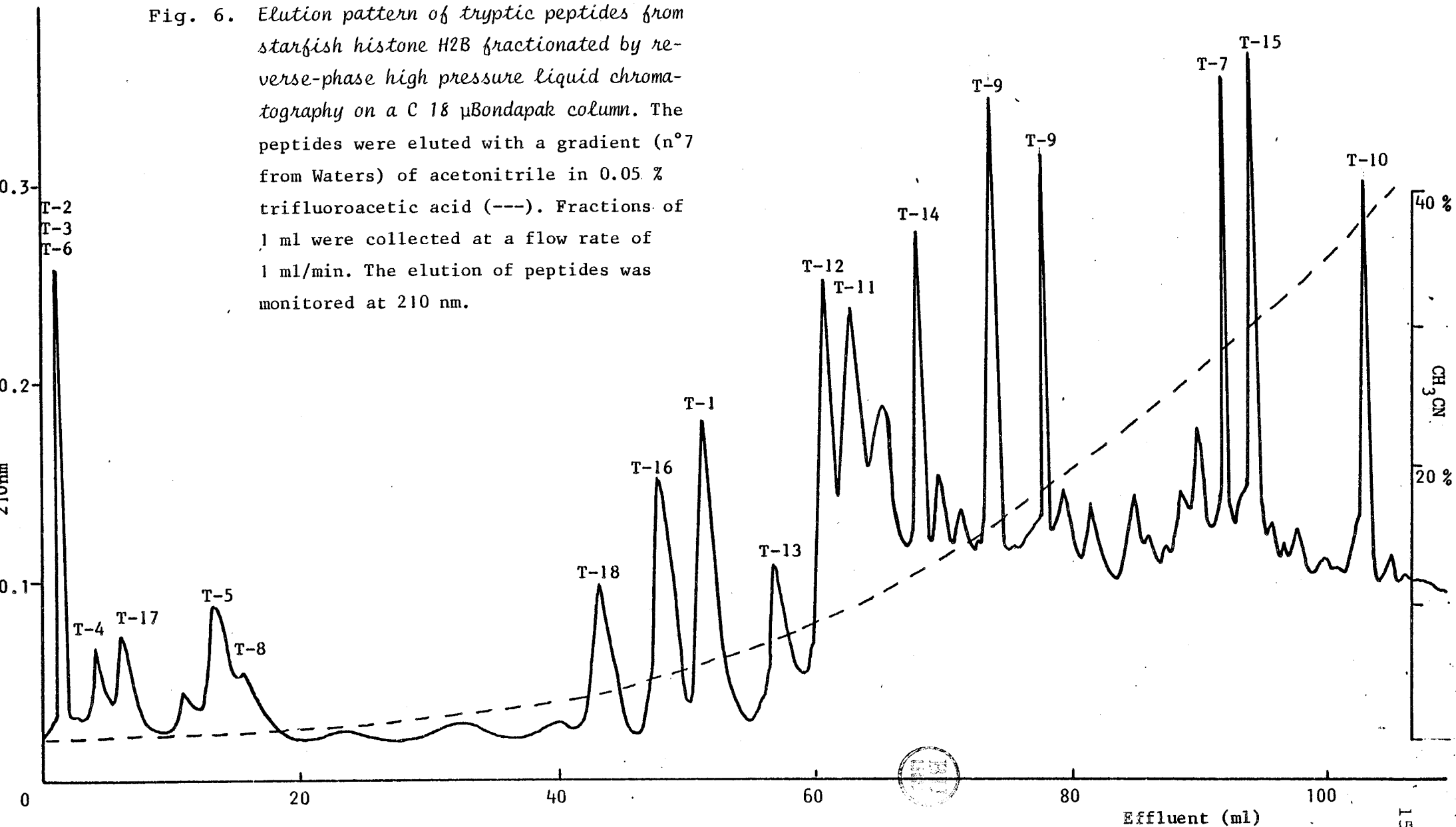
Tryptic Peptides from the Native Protein

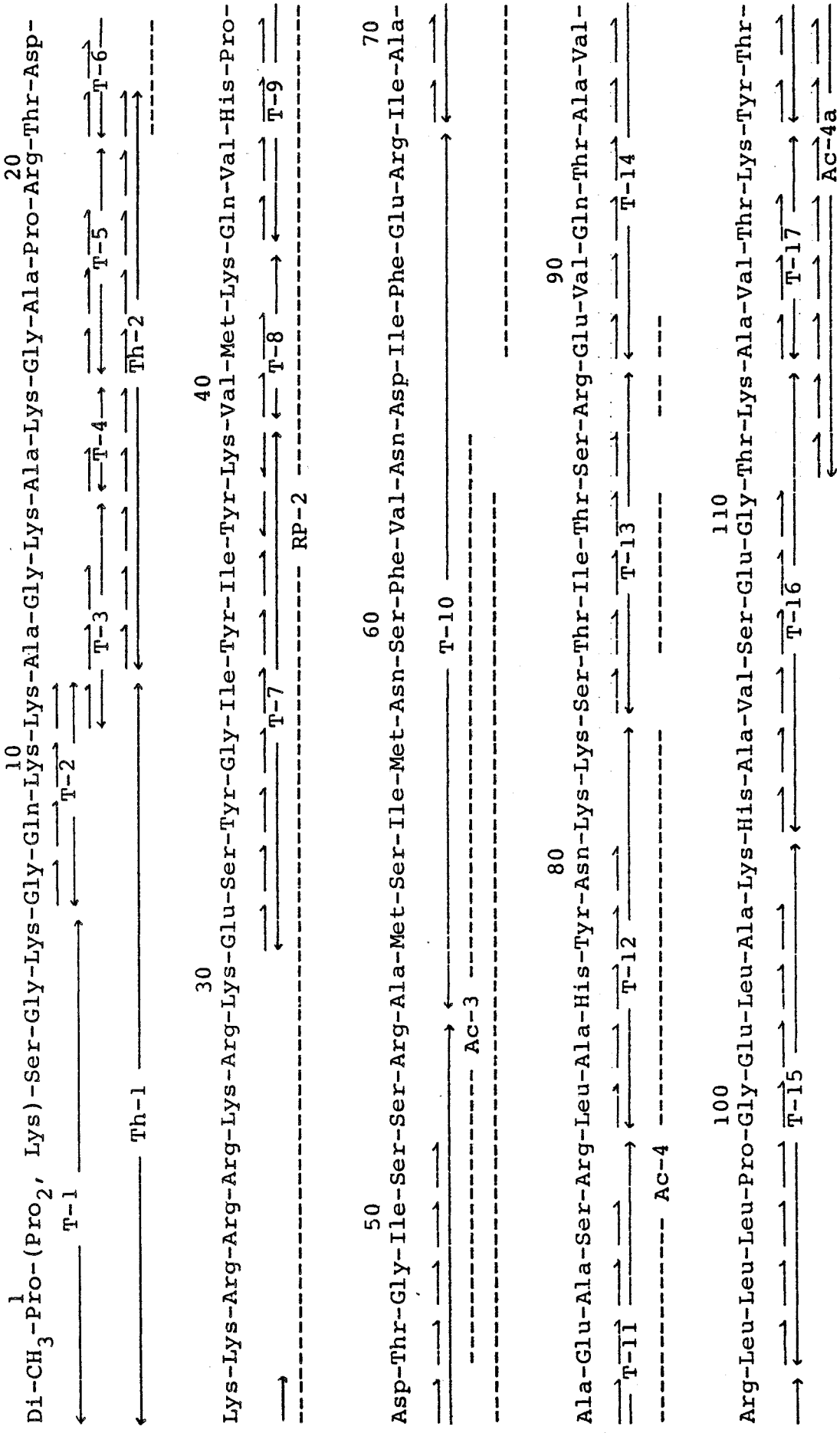
A 2 h-hydrolysis of starfish histone H2B with trypsin yielded 18 peptides which were separated by reverse-phase high pressure liquid chromatography (Fig. 6). Their amino acid composition is given in Table 2. Structural studies of the tryptic peptides were used to complete the carboxy-terminal sequence of the protein and to confirm the data obtained from the automated sequencing of the large fragments. The sequence of the 121 amino acid residues of starfish H2B is presented in Fig. 7.

DISCUSSION

The 121 residues of histone H2B from gonads of the starfish *Asterias rubens* were aligned from structural data obtained essentially from large peptides generated by cleavage of the protein at aspartyl residues and by limited enzymatic hydrolysis of the dimer H2A-H2B.

Fig. 6. Elution pattern of tryptic peptides from starfish histone H2B fractionated by reverse-phase high pressure liquid chromatography on a C 18 μ Bondapak column. The peptides were eluted with a gradient (n^o7 from Waters) of acetonitrile in 0.05 % trifluoroacetic acid (---). Fractions of 1 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min. The elution of peptides was monitored at 210 nm.





The strong interactions induced at high ionic strength between the hydrophobic domains of histones H2A and H2B delimit a protected sequence in both proteins, inaccessible to proteolytic cleavage by trypsin or related enzyme such as protease from submaxillary gland of mouse which cleaves specifically the arginyl bonds.

The changes observed in the primary structure of starfish H2B by comparison with that of calf H2B, occur mostly in the amino-terminal sequence (residues 1-21) where no real sequence homology can be found between the two proteins (Table 3).

One deletion and eleven substitutions are observed in the sequence 22-121. One of these substitutions is not conservative and involves the replacement of a serine residue (at position 32 in calf H2B) by a lysine residue (at position 28 in starfish H2B). This punctual change builds up a cluster of eight basic residues (sequence 23-30) and leads to the disappearance of a potential site of phosphorylation [13, 32, 33].

Contrary to the histones H2B present in the sperm cells of sea urchin [16-18], the histone H2B from starfish gonads (this work) or from starfish sperm cells [19] does not possess an extended amino-terminal region with repetitive sequences. The extensive structural variations observed in sea urchin histones H2B must therefore be considered as specific of Echinidae.

Moreover, the chromatin of starfish gonads or starfish sperm cells [19] contains only a single type of histone H2B whereas that of sea urchin sperm cells contains three H2B variants.

Table 3. Comparison of the sequences of histone H2B from starfish and from calf

Deletion is indicated by —. Numbering in this table refers to sequence positions in calf thymus histone H2B.

Species	Residues at position
Calf thymus [11]	¹ Pro-Glu-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Ala-Pro-Lys-Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-Ala-Val-Thr-Lys- ²⁰
Starfish gonads	Di-CH ₃ -Pro-(Pro ₂ , Lys)-Ser-Gly-Lys-Gly-Gln-Lys-Lys-Ala-Gly-Lys-Ala-Lys-Gly-
Calf thymus	Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly ²⁶ ³⁰ Lys ³² Ser ³⁸ Ser-Val ⁴¹ Val ⁴⁵ Leu ⁵⁷ Lys
Starfish gonads	Ala-Pro-Arg-Thr-Asp-— Arg Lys Gly-Ile Ile Met Arg
Calf thymus	⁶⁰ Gly ⁷⁵ Gly ⁸⁶ Arg ⁹⁴ Ile ¹²³ Ser
Starfish gonads	Ser Ala Lys Val Thr



Another interesting structural feature of starfish histone H2B is the presence of N-dimethylproline at its amino-terminal end. The N-terminal blocking by methylation has also been found in *Tetrahymena* H2B [21, 22] ; in this case, the blocked residue was identified as trimethylalanine.

Generally histone H2B has a free amino-terminal group which is proline [1]. However in some histones H2B of plant or animal origin the amino-terminal end has been reported blocked by a group which remains unknown [1, 20].

The post-synthetic methylation of the amino-terminal residue has already been observed in *E. coli* ribosomal proteins L 11 [34], L 16, L 33 and S 11 [35] and in *Criethidia oncopelti* cytochrome c [36].

N-dimethylproline is the blocked amino-terminal residue of the protozoan cytochrome c.


By comparison with N-terminal acetylation which is commonly found in histones H1, H2A and H4, the N-terminal methylation is rarely observed.

At the present time the functional significance of the N-terminal methylation as well as that of the proline-rich nature of the amino-terminal sequence of the starfish histone remain to be defined.

REFERENCES

1. Von Holt, C., Strickland, W.N., Brandt, W.F. & Strickland, M.S. (1979) *FEBS-Lett.* 100, 201-218.
2. Elgin, S.C.R. & Weintraub, H. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* 44, 725-774.
3. Wouters-Tyrou, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1976) *FEBS-Lett.* 65, 225-228.
4. Sautière, P., Tyrou, D., Laine, B., Mizon, J., Ruffin, P. & Biserte, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 41, 563-576.
5. Laine, B., Sautière, P. & Biserte, G. (1976) *Biochemistry* 15, 1640-1645.
6. Laine, B., Kmiécik, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1978) *Biochimie (Paris)* 60, 147-150.
7. Wouters, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 231-239.
8. Wouters-Tyrou, D., Martin-Ponthieu, A., Briand, G., Sautière, P. & Biserte, G. (1982) *Eur. J. Biochem.* 124, 489-498.

9. Martinage, A., Bélaïche, D., Dupressoir, T. & Sautière, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 130, 465-472.
10. Kmiécik, D., Couppez, M., Bélaïche, D. & Sautière, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* 135, 113-121.
11. Iwai, K., Hayashi, H. & Ishikawa, K. (1972) *J. Biochem. (Tokyo)* 72, 357-367.
12. Kootstra, A. & Bailey, G.S. (1978) *Biochemistry* 17, 2504-2510.
13. Martinage, A., Mangeat, P., Sautière, P., Marchis-Mouren, G. & Biserte, G. (1979) *Biochimie (Paris)* 61, 61-69.
14. Ohe, Y., Hayashi, H. & Iwai, K. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)* 85, 615-624.
15. Van Helden, P.D., Strickland, W.N., Strickland, M. & Von Holt, C. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 703, 17-20.
16. Strickland, M., Strickland, W.N., Brandt, W.F. & Von Holt, C. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 263-275.
17. Strickland, W.N., Strickland, M., Brandt, W.F. & Von Holt, C. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 277-286.

18. Strickland, M., Strickland, W.N., Brandt, W.F.,
Von Holt, C., Wittmann-Liebold, B. & Lehmann,
A. (1978) *Eur. J. Biochem.* 89, 443-452.
19. Van Helden, P.D., Strickland, W.N., Brandt, W.F.
& Von Holt, C. (1979) *Eur. J. Biochem.* 93,
71-78.
20. Strickland, M.S., Strickland, W.N. & Von Holt, C.
(1980) *Eur. J. Biochem.* 106, 541-548. 
21. Nomoto, M., Hayashi, H. & Iwai, K. (1982) *J. Biochem.*
(Tokyo) 91, 897-904.
22. Nomoto, M., Kyogoku, Y. & Iwai, K. (1982) *J. Biochem.*
(Tokyo) 92, 1675-1678.
23. Strickland, M., Strickland, W.N., Brandt, W.F. &
Von Holt, C. (1974) *FEBS-Lett.* 40, 346-348.
24. Johns, E.W. (1967) *Biochem. J.* 105, 611-614.
25. Martinage, A., Sautière, P., Kerckaert, J.P. &
Biserte, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 420,
37-41.
26. Panyim, S. & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Bio-*
phys. 130, 337-346.

27. Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S.B., ed.) 2nd ed., pp. 232-279, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
28. Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M. & McKean, D. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 622-627.
29. Klapper, D.G., Wilde, C.E. & Capra, J.D. (1978) *Anal. Biochem.* 85, 126-131.
30. Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Neurath, H. & Walsh, K.A. (1978) *Biochemistry* 17, 5672-5679.
31. Gros, C. & Labouesse, B. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 463-470.
32. Hashimoto, E., Takeda, M., Nishizuka, Y., Hamana, K. & Iwai, K. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 547-555.
33. Kuroda, Y., Hashimoto, E., Nishizuka, Y., Hamana, K. & Iwai, K. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 629-635.
34. Sugeno, K., Narita, K. & Titani, K. (1971) *J. Biochem. (Tokyo)* 70, 659-682.

35. Delange, R.J., Glazer, A.N. & Smith, E.L. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 3325-3327.

36. Frank, G. & Weeds, A.G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 44,
317-334.

DISCUSSION

La structure primaire des histones H2A et H2B isolées de l'Echinoderme *Asterias rubens* a été déterminée. Ces deux histones qui interagissent pour former le dimère H2A-H2B ont une séquence légèrement plus courte que leurs homologues de thymus de Veau. Les délétions sont observées dans les régions basiques C-terminale pour l'histone H2A, N-terminale pour l'histone H2B. Les quatre délétions dans la région C-terminale de l'histone H2A et en particulier la perte de deux résidus d'histidine (aux positions 123-124 dans le thymus de Veau) sont une caractéristique de l'histone H2A des poissons (BAILEY et DIXON, 1973) et des invertébrés (WOUTERS et coll., 1978, 1982 ; STRICKLAND et coll., 1980 ; KMIĘCIK et coll., 1983). A l'extrémité N-terminale basique de cette histone, on note une cinquième délétion (perte d'un résidu de Gln en position 6) qui conduit à une identité totale entre les séquences N-terminales des histones H2A et H4.

La substitution partielle aux positions 19, 40 et 50 des résidus de sérine, d'acide glutamique et de leucine par des résidus d'alanine, de glutamine et d'asparagine révèle la présence d'au moins deux variants de l'histone H2A d'Etoile de mer. Notamment, la substitution Ser → Ala en position 19 conduit à la perte d'un site important de phosphorylation dans l'un des variants de l'histone H2A. Ceci est observé également dans les trois variants de l'histone H2A de blé où la sérine 19 est remplacée par une isoleucine ou par une valine (VON HOLT et coll., 1979). Depuis la découverte des variants d'histones (FRANKLIN et ZWEIDLER, 1977) leur nombre

n'a cessé de croître avec l'amélioration des techniques électrophorétiques et des variants ou sous-types des histones H1, H2A, H2B et H3 d'origine diverse ont été décrits ; aucun variant de l'histone H4 n'a, à ce jour, été mis en évidence. Ces sous-types d'histones sont, nous l'avons vu, un des facteurs de l'hétérogénéité des nucléosomes et lorsque les variations structurales entraînent la perte de sites potentiels de phosphorylation, il faut admettre que les interactions histone-DNA au sein du nucléosome sont régulées par d'autres mécanismes tels que l'acétylation ou l'ADP-ribosylation.

La région centrale hydrophobe de l'histone H2A qui interagit avec l'histone H2B apparaît généralement conservée au cours de l'évolution. Cependant, dans l'histone H2A d'Etoile de mer, huit substitutions sur les douze observées sont localisées dans la région centrale (résidus 20-117). Parmi elles, quatre ne sont pas conservatives et entraînent soit une modification de charge (Glu → Gln, Lys → Gly), soit une modification de l'encombrement stérique (Leu → Asn, Ile → Asn). Ces substitutions dans la zone centrale de l'histone H2A pourraient être associées à un déplacement des zones d'interaction avec l'histone H2B comme cela a été mis en évidence après hydrolyse enzymatique ménagée du complexe H2A-H2B.

Les changements observés dans la séquence de l'histone H2B d'Etoile de mer par rapport à son homologue de Veau sont essentiellement localisés dans la région N-terminale où aucune homologie de séquence entre les deux protéines ne peut être décelée. Alors que la chromatine de sperme d'Oursin renferme trois variants de l'histone H2B caractérisés par un allongement de la séquence aminée-terminale et par la présence de séquences répétitives

(STRICKLAND et coll., 1978), l'histone H2B de gonades d'Etoile de mer est unique (absence de variants) et possède au contraire une séquence aminée-terminale variable plus courte que celle de l'histone homologue de thymus de Veau. Une substitution non conservative (Ser dans le Veau \rightarrow Lys dans l'Etoile de mer) entraîne la disparition d'un site important de phosphorylation et l'apparition d'un centre basique de huit résidus (séquence 23 à 30). De plus, l'histone H2B d'Etoile de mer est caractérisée par :

- la présence d'une extrémité N-terminale bloquée par un résidu de diméthylproline
- la richesse en proline de l'extrémité N-terminale (3 prolines sur les quatre premiers acides aminés de la chaîne protéique).

La présence d'un résidu de diméthylproline dans l'histone H2B est exceptionnelle. Généralement, l'histone H2B a une extrémité N-terminale libre (proline non modifiée) ; cependant, quelques exceptions ont été décrites où cette histone est bloquée par un résidu qui n'a pas été identifié (comme dans le sperme d'Etoile de mer : STRICKLAND et coll., 1980) ou par un résidu de triméthylalanine (chez le protozoaire cilié *Tetrahymena* : NOMOTO et coll., 1982). La présence de N-diméthylproline associée à une séquence riche en proline de la région N-terminale a été décrite également dans le cytochrome c (PETTIGREW et SMITH, 1977). L'accumulation de proline à l'extrémité N-terminale pourrait avoir un rôle de protection de la protéine contre l'action des exopeptidases et dans l'histone H2B, le rôle de la méthylation N-terminale reste à déterminer.

CHAPITRE IV

ETUDE DES SITES DE PHOSPHORYLATION DANS LES HISTONES
INDIVIDUELLES ET LES COMPLEXES D'HISTONES

PLAN DU CHAPITRE IV

ETUDE DES SITES DE PHOSPHORYLATION DANS LES HISTONES INDIVIDUELLES
ET LES COMPLEXES D'HISTONES

IV - 1 PHOSPHORYLATION DES HISTONES ET DES COMPLEXES D'HISTONES

PAR UNE KINASE DEPENDANTE DE L'AMP CYCLIQUE

IV - 1-1 Identification des sites de phosphorylation
dans l'histone H2B.

Publication 3

Amino acid sequence of rat thymus histone H2B and identification of the in vitro phosphorylation sites.

A.MARTINAGE, P.MANGEAT, P.SAUTIERE, G.MARCHIS-MOUREN and G.BISERTE
Biochimie (1979), 61, 61-69.

IV - 1-2 Phosphorylation des histones individuelles H5,
H2A et du dimère H2A-H2B.

Publication 4

In vitro phosphorylation of histones H5, H2A, H2B and of the dimer H2A-H2B by a cyclic AMP-dependent protein kinase from rat pancreas.

A.MARTINAGE, P.MANGEAT, B.LAINE, M.COUPPEZ, P.SAUTIERE, G.MARCHIS-MOUREN and G.BISERTE
FEBS Letters (1980), 118, 323-329.

IV - 1-3 Phosphorylation des histones H3, H4. Importance
de l'interaction des histones H3 et H4 : phosphorylation des tétramères (H3-H4)₂ non acétylé et acétylé.

Publication 5

Study of in vitro phosphorylation of histones H3, H4 and of the non-acetylated and acetylated tetramers (H3-H4)₂

A.MARTINAGE, P.MANGEAT, P.SAUTIERE, M.COUPPEZ, G.MARCHIS-MOUREN and G.BISERTE
FEBS Letters (1981), 134, 107-110.

IV - 2 PHOSPHORYLATION DE L'HISTONE H5 PAR UNE KINASE INDEPENDANTE

DE L'AMP CYCLIQUE

Publication 6

Phosphorylated sites of chicken erythrocyte histone H5 by a cyclic AMP-independent protein kinase from mouse plasmocytoma cells.

A.MARTINAGE, C.QUIRIN-STRICKER, M.CHAMPAGNE and P.SAUTIERE
FEBS Letters (1981), 134, 103-106.

IV - I PHOSPHORYLATION DES HISTONES INDIVIDUELLES ET DES COMPLEXES
D'HISTONES PAR UNE KINASE DEPENDANTE DE L'AMP-CYCLIQUE

La phosphorylation des histones est une modification post-synthétique impliquée dans la régulation de nombreuses activités de la cellule et plus particulièrement dans les changements de structure de la chromatine.

La phosphorylation est une réaction enzymatique catalysée par différents types de protéines kinases. Les kinases sont, ou non, activées par les nucléotides cycliques, d'autres nécessitent la présence d'effecteurs comme le calcium, les phospholipides. Elles catalysent le transfert du groupement phosphate en position γ de l'ATP sur le groupe hydroxyle de la sérine, de la thréonine ou de la tyrosine.

Toutes les histones sont phosphorylées par les kinases activées par l'AMP-cyclique mais à des degrés divers suivant l'enzyme utilisé et suivant l'histone considérée.

Le rôle important attribué à cette modification des histones nous a conduit en 1977 à étudier la phosphorylation des histones. Ceci ouvrait une collaboration avec le Professeur Guy MARCHIS-MOUREN et le Docteur Paul MANGEAT qui, ayant isolé et purifié la sous-unité catalytique d'une protéine kinase AMP-cyclique dépendante, extraite du pancréas de Rat, cherchaient à identifier les meilleurs substrats pour cet enzyme.

La première étape de cette collaboration fut donc une étude cinétique de l'incorporation de phosphate $[^{32}\text{P}]$ dans chaque histone. La réaction de phosphorylation par la sous-unité catalytique de la protéine kinase de pancréas de Rat est réalisée en dissolvant la protéine dans du tampon Tris-HCl 30 mM pH 7.8 contenant MgCl_2 12 mM. Le mélange est incubé à 30°C avec la kinase (0.2-0.3 μg enzyme/ml) en présence de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 0.4 mM pendant différents temps. Les résultats sont présentés dans la figure 17. Il apparaît que l'histone H3 est seulement légèrement phosphorylée tandis que l'histone H4 n'incorpore pas de $[^{32}\text{P}]$. Les histones H1 et H2A incorporent un même taux de $[^{32}\text{P}]$ tandis que les histones H2B et H5 apparaissent nettement comme les meilleurs substrats pour la kinase de pancréas de Rat. Ainsi, nous avons phosphorylé, *in vitro*, l'histone H2B de thymus de Rat dont nous venions de déterminer la structure primaire en vue de localiser les sites de phosphorylation.

IV - 1-1 Identification des sites de phosphorylation dans

l'histone H2B : Publication 3.

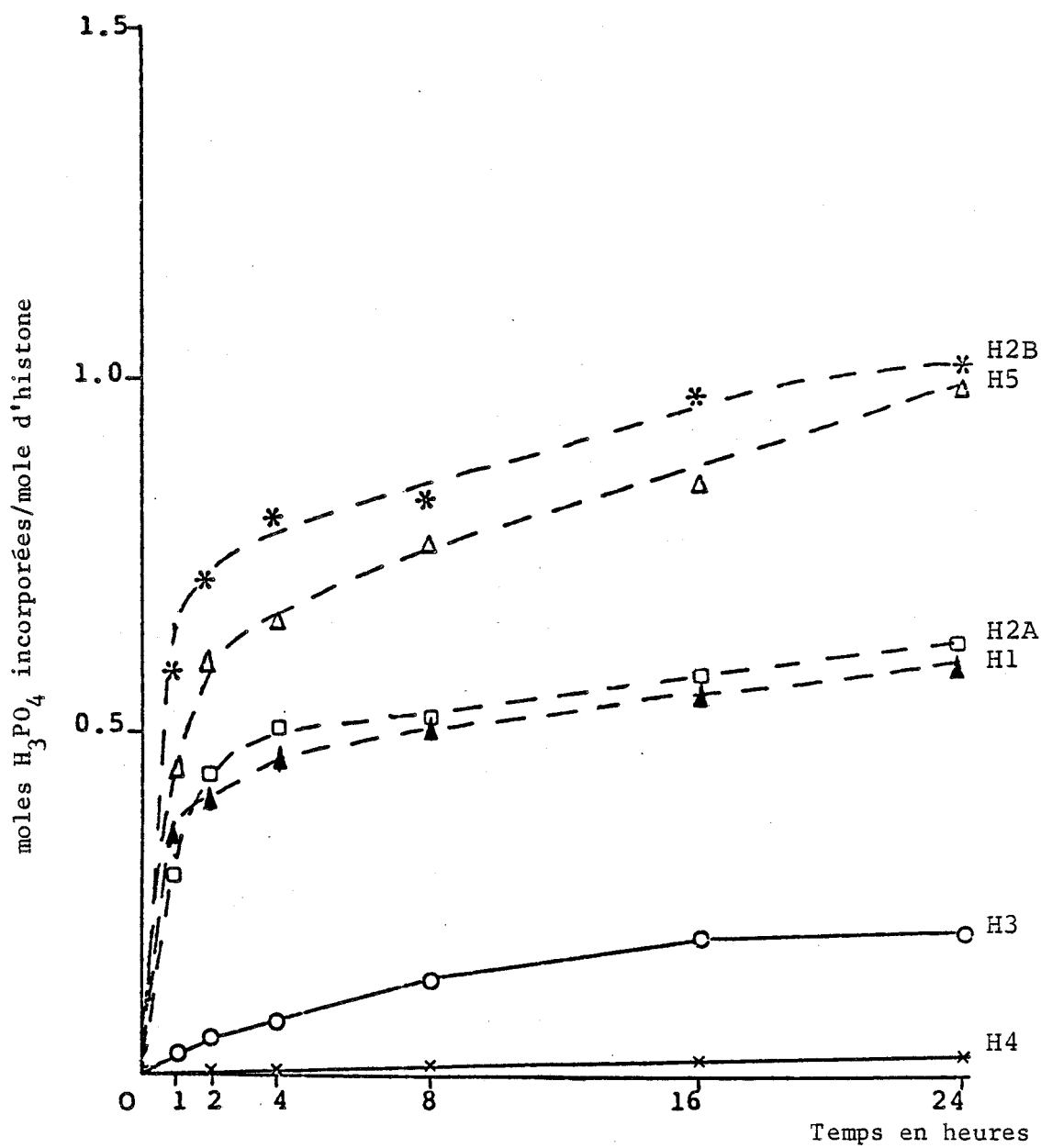


FIGURE 17. CINETIQUE D'INCORPORATION DU PHOSPHATE ^{32}P DANS LES HISTONES ISOLEES.

BIOCHIMIE, 1979, 61, 61-69.

Amino acid sequence of rat thymus histone H2B and identification of the *in vitro* phosphorylation sites.

Arlette MARTINAGE, Paul MANGEAT *,
Pierre SAUTIÈRE ◊, Guy MARCHIS-MOUREN *
and Gérard BISERTE.

(29-8-1978).

Unité 124 INSERM
et Institut de Recherches sur le Cancer de Lille,
B.P. n° 3567, 59020 Lille Cédex
and

* Institut de Chimie Biologique,
Université d'Aix-Marseille,
Place Victor-Hugo, 13331 Marseille Cédex 03,
France.

Résumé.

La séquence en acides aminés de l'histone de thymus de rat, obtenue à l'état très pur par électrophorèse préparative, a été déterminée. Cette séquence est identique à celle de l'histone H2B de thymus de veau. La phosphorylation *in vitro* de l'histone de rat avec une protéine kinase activée par l'AMP cyclique isolée du pancréas de rat, conduit à l'identification de quatre sites de phosphorylation : deux sites majeurs, non spécifiques, sur les résidus de sérine 32 et 36, et deux sites mineurs, spécifiques de la protéine kinase de rat, sur les résidus de sérine 87 et 91.

Introduction.

The primary structure of histone H2B has been determined in three species, calf [1], trout [2] and more recently sea-urchin [3, 4] and a comparative study of the sequences has shown that most of the observed changes occurred in the N-terminal half of the molecule.

The N-terminal sequence of the histone H2B is highly basic and is probably a privileged site of electrostatic interactions with the phosphate groups of the DNA. The regulation of these interactions is ensured by a system of phosphorylation-dephosphorylation.

The abbreviations used are : Cyclic AMP, adenosine 3':5'-monophosphate ; TPCK, L-(1-tosylamido-2-phenyl) ethyl chloromethyl ketone.

◊ To whom all correspondence should be addressed.

Summary.

The amino acid sequence of rat thymus histone obtained in highly purified form by preparative electrophoresis, was determined. This sequence is identical to the sequence of calf thymus histone H2B. The *in vitro* phosphorylation of the rat histone with a cyclic AMP-dependent protein kinase isolated from rat pancreas led to the identification of four sites of phosphorylation : two major ones, at serine residues 32 and 36, and two minor ones, specific of the rat protein kinase, at serine residues 87 and 91.

Two major sites of *in vitro* phosphorylation from silkworm [5] or from bovine cerebellum [6] have been localized at serine 32 and serine 36 in calf histone H2B.

From these results, the enzyme does not seem to have any species specificity. In order to ascertain this lack of specificity we have prepared the cyclic AMP-dependent protein kinase from rat pancreas and we have used the rat thymus histone H2B as substrate for our phosphorylation assays *in vitro*. The amino acid sequence of the rat histone H2B was deduced from the structural data provided by the tryptic peptides separated by ion exchange column chromatography. This methodology set up for separation of unlabelled peptides was then applied to that of [³²P] labelled peptides. Four sites of phosphorylation were identified in rat thymus histone H2B : two major sites, at serine residues 32 and 36, two minor at

A. Martinage and coll.

serine residues 87 and 91. The two minor sites appear to be specific for the rat pancreas protein kinase.

Materials and Methods.

Thymus glands excised from two month old Wistar Rats, were frozen immediately on dry ice and kept at -30°C until use.

Isolation of histone H2B.

The F_{25} fraction was obtained from rat thymus chromatin by the method described by Johns [7]. This fraction contained histone H2B but also histones H3 and H2A.

Highly purified histone H2B was isolated by preparative electrophoresis at pH 2.7, in 2.5 M urea, on polyacrylamide slab gel according to Martinage *et al.* [8].

Purity of the preparation was assessed by analytical gel electrophoresis as described previously [8].

Amino acid analyses.

Histone samples were hydrolyzed *in vacuo* at 110°C for 24, 48 and 72 h in 6 M HCl. One drop of 1 per cent phenol was added to prevent excessive degradation of tyrosine. Amino acid analyses were performed on a Beckman Multichrom amino acid analyser equipped with an Infotronics Integrator model CRS-210.

End group determination.

The amino terminal group of histone H2B was determined by dansylation according to the method of Gros and Labouesse [9].

For the carboxy-terminal sequence determination, the histone H2B was hydrolyzed in 0.2 M *N*-ethylmorpholine buffer, pH 8.5 at 40°C , with carboxypeptidases B and A.

Aliquots were taken off at time points, freeze dried and analysed on the amino acid analyser.

Tryptic hydrolysis.

The protein was hydrolyzed for 2 hours at pH 8.0 and 37°C in 0.1 M ammonium bicarbonate with TPCK-treated trypsin (Worthington), using an enzyme to substrate ratio of 1/50. Hydrolysis was stopped by lowering the pH to 3.5 with formic acid.

Fractionation of the tryptic peptides was performed on Chromobeads P column (Technicon Corporation) with pyridine-formate and pyridine-acetate buffers used in a gradient system from 0.1 M in pyridine

at pH 2.9 to 2.0 M in pyridine at pH 5.0 [10]. Further purification of the peptides was achieved as described previously [11].

The sequence of the peptides was established by Edman degradation with direct identification of phenylthiohydantoin amino acids on silica gel thin-layer microchromatography as described by Cohen-Solal and Bernard [12]. Phenylthiohydantoin derivatives of histidine and arginine were identified by high voltage electrophoresis on Whatman 3 MM paper followed by specific staining with Pauly reagent and phenanthrene quinone reagent [13] respectively.

Protein-kinase extraction and purification.

The procedure of purification which leads to the isolation of the catalytic subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase, is a slight modification of the procedure previously described [14].

Pancreas from 15 male Wistar Rats weighing 250 g, were homogenized in 0.3 M sucrose containing 1 mM benzamidine and 6 mM β -mercaptoethanol. The homogenate was centrifuged for 1.5 h at 60,000 rpm in a 65 Beckman rotor and the supernatant (S_1) collected.

The pellet was resuspended in a pH 7.8 medium containing 50 mM NaCl, 125 mM NaHCO_3 , 1 mM benzamidine, 6 mM β -mercaptoethanol. The suspension was centrifuged for 45 min in the same conditions as above. The supernatant (S_2) was collected. S_1 and S_2 were pooled and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added up to 2.4 M final concentration. After centrifugation the supernatant was discarded and the pellet was dissolved in 30 ml of 50 mM sodium phosphate pH 6.8 containing 1 mM benzamidine, 2 mM EDTA and 6 mM β -mercaptoethanol. This solution was filtered through a 5×100 cm G 75-Sephadex column equilibrated with the same buffer. The 1-1.5 Vo eluted fraction was pooled and loaded onto a 1.5×30 cm DEAE-Sepharose column equilibrated with the same buffer. After washing the column with the equilibration buffer the protein-kinase was eluted by the same buffer except that the phosphate concentration was 45 mM and that 10 μM cyclic AMP was present.

The fractions containing the enzyme were pooled and diluted twice with water and loaded onto a 1.5×30 cm CM-Sepharose column equilibrated with 25 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) containing 1 mM benzamidine and 6 mM β -mercaptoethanol. The enzyme was eluted by a linear gradient of NaCl from 0 to 0.3 M using 200 ml of starting buffer and 200 ml of final buffer.

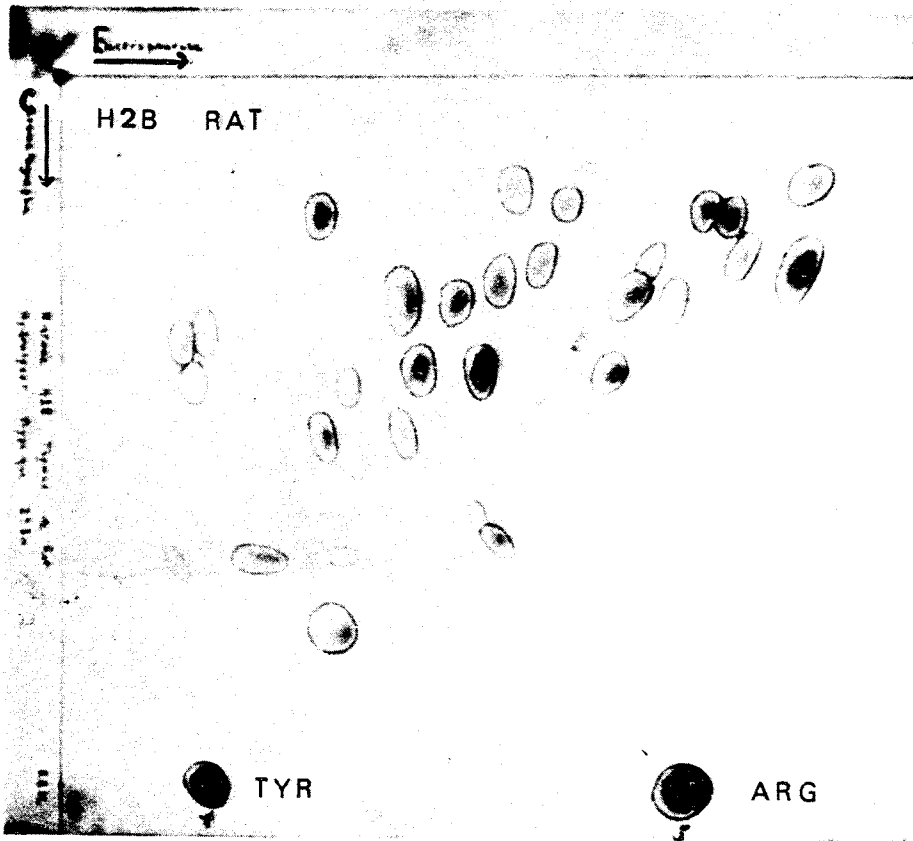
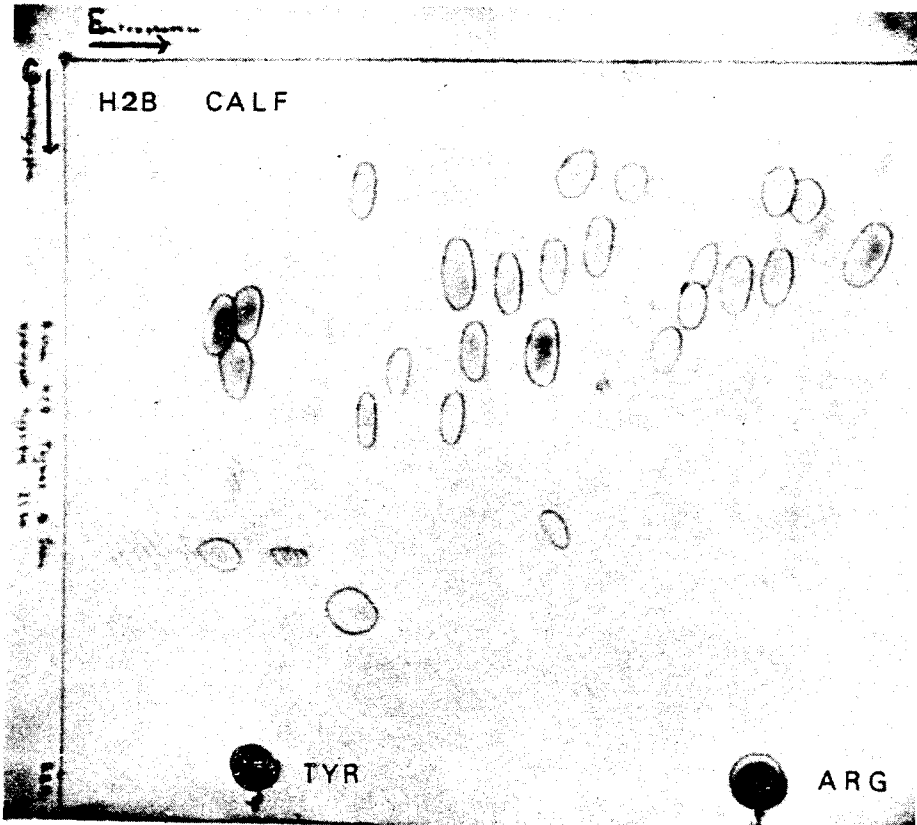
Phosphorylation conditions.

About 20 mg of histone were incubated for 24 h at 30° (the histone final concentration was 0.5 mg/ml), in the presence of 0.4 mM $\gamma^{32}\text{P}$ ATP (75 μCi), 30 mM Tris HCl pH 7.8 and 12 mM MgCl_2 . The enzyme concentration was 1-1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The incubate was dialyzed against water (6 l) for 24 h and lyophilized.

FIG. 1. — Peptide maps on Whatman 3 MM paper of the tryptic digests of calf and rat H2B.

Chromatography (C) was run for 18 hours in the solvent system: 1-butanol-pyridine-acetic acid-water (15:10:3:12) (v/v).

Electrophoresis (E) was run for 90 minutes at 2 200 volts in a pyridine-acetate buffer pH 3.6. Maps were stained with ninhydrin-cadmium reagent [15].



A. Martinage and coll.

Tryptic hydrolysis and location of radioactive peptides.

21 mg of protein labelled with [^{32}P] were dissolved in 2.5 ml of 0.1 M *N*-methylmorpholine, pH 8.0 and hydrolyzed for 2 hours at 37°C with TPCK-treated trypsin using an enzyme to substrate ratio of 1/50.

An aliquot of the hydrolysate was taken for peptide mapping on Whatman 3 MM paper. Before staining with the ninhydrine-cadmium reagent [15], the radioactive peptides were located on the map by radioautography, using Kodirex film 45 × 45 cm (Kodak) with a 48 hours exposure.

The tryptic hydrolysate was fractionated by ion exchange chromatography as described above. Elution of the peptides was monitored automatically by ninhydrin reaction.

The radioactivity was then measured with a liquid scintillation counter (Nuclear Chicago) on an aliquot of each peptidic fraction.

Results.

Rat thymus histone H2B, in highly purified form, was obtained from fraction F_{2b} of Johns by preparative electrophoresis, using a polyacrylamide slab gel, with a yield of about 45 per cent.

Histone H2B was characterized by its electrophoretic mobility in an analytical polyacrylamide gel at pH 2.7 and by its amino acid composition which is presented in table I.

The composition of this histone is very similar to that of the calf thymus homologous histone.

The amino-terminal group was found to be proline, after dansylation.

TABLE I.
Amino acid composition of the H2B histone from rat thymus.

Amino acids	Moles per cent		Calculated residues	
	Rat thymus	Calf thymus	Rat thymus	Calf thymus
Aspartic acid	5.14	4.9	6.4 (6)	6
Threonine (*)	6.05	6.1	7.6 (8)	8
Serine (*)	11.08	10.7	13.8 (14)	14
Glutamic acid	7.99	7.6	10.0 (10)	10
Proline	4.61	4.8	5.8 (6)	6
Glycine	6.08	5.5	7.6 (7)**	7
Alanine	10.24	10.1	12.8 (13)	13
Valine	7.14	7.0	8.9 (9)	9
Methionine	1.37	1.5	1.7 (2)	2
Isoleucine	4.71	4.9	5.9 (6)	6
Leucine	5.46	4.9	6.8 (6)**	6
Tyrosine	3.61	3.8	4.5 (5)	5
Phenylalanine	1.38	1.6	1.7 (2)	2
Histidine	2.57	2.2	3.2 (3)	3
Lysine	15.90	16.6	19.9 (20)	20
Arginine	6.63	6.2	8.3 (8)	8

Values, expressed as moles per cent of all amino acids are average of 9 determinations with 24, 48 and 72 hours-hydrolysates. Amino acid composition of the H2B histone from calf thymus [1] is given for comparison.

(*) Values for threonine and serine are obtained by linear extrapolation to zero time of hydrolysis.

(**) Values deduced from the sequence study.

Amino acid composition of each phosphopeptide was determined after hydrolysis in 6 N HCl for 24 h at 110°C under vacuum. In these conditions, the rate of decomposition of *O*-phosphoamino acids was complete [16].

The phosphorylated sites in histones H2B were identified by sequencing the phosphopeptides by Edman degradation and measuring the radioactivity after each cycle involving the elimination of a serine residue.

The carboxy-terminal sequence Ser-Lys was deduced from the study of the hydrolysis of the protein with carboxypeptidases B and A.

The insoluble material which precipitated during the tryptic hydrolysis, was removed by centrifugation. This material, soluble in 30 per cent acetic acid corresponds to the tryptic insoluble

A. Martinage and coll.

core coming from the hydrophobic sequence located in the median part of the protein.

The elution diagram of the soluble tryptic peptides is shown in figure 2. Most of the peptides

TABLE II.
Amino acid composition of the tryptic peptides of rat thymus histone H2B.

Amino acids	T-1	T-2	T-3	T-3a	T-4 T-20	T-5	T-5a	T-6	T-6a	T-7 T-8	T-9	T-10	T-10a
Aspartic acid								1.0 (1)	1.2 (1)				
Threonine					1.0 (1)								
Serine		0.8 (1)	0.9 (1)	1.2 (1)							0.8 (1)	1.4 (2)	1.5 (2)
Glutamic acid	0.9 (1)					1.1 (1)	1.0 (1)					1.0 (1)	1.3 (1)
Proline	1.8 (2)	2.0 (2)											
Glycine			1.1 (1)	1.3 (1)				1.3 (1)	1.4 (1)				
Alanine	1.0 (1)	1.9 (2)			1.1 (1)	0.9 (1)	1.1 (1)						
Valine					1.0 (1)							1.9 (2)	1.8 (2)
Methionine													
Isoleucine													
Leucine													
Tyrosine												2.7 (3)	2.4 (3)
Phenylalanine													
Lysine	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)	2.0 (2)	1.0 (1)	2.0 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	2.2 (2)
Histidine													
Arginine										1.0 (1)	1.0 (1)		
Number of residues	5	6	3	4	4	3	4	3	4	2	3	9	10
Yield (per cent)	10.8	17.3	2.0	13.0	28.0	12.1	2.6	4.3	2.6	6.5	8.6	6.0	2.8

TABLE II (continued).
Amino acid composition of the tryptic peptides of rat thymus histone H2B.

Amino acids	T-11	T-12	T-13	T-14	T-15	T-16	T-17	T-18	T-19	T-21
Aspartic acid		0.9 (1)	3.0 (3)		1.1 (1)					
Threonine		0.9 (1)				1.8 (2)	1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)
Serine		1.6 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)		1.9 (2)			1.2 (1)	1.7 (2)
Glutamic acid		1.0 (1)	1.3 (1)	1.1 (1)			1.9 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)	
Proline		1.0 (1)						1.0 (1)		
Glycine		1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)				1.3 (1)	1.2 (1)	
Alanine			1.0 (1)	1.9 (2)	1.1 (1)		1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	
Valine	0.9 (1)	0.9 (1)	1.1 (1)				1.0 (1)		1.0 (1)	
Methionine			1.4 (2)							
Isoleucine		0.9 (1)	1.9 (2)	1.0 (1)		1.0 (1)	0.9 (1)			
Leucine	0.9 (1)				0.8 (1)			3.6 (4)		
Tyrosine					0.6 (1)					0.7 (1)
Phenylalanine			2.0 (2)							
Lysine	1.0 (1)	1.0 (1)			1.0 (1)			1.0 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)
Histidine		0.9 (1)			1.2 (1)				0.9 (1)	
Arginine			1.0 (1)	1.0 (1)		1.0 (1)	1.0 (1)			
Number of residues	3	11	15	7	6	6	7	9	8	5
Yield (per cent)	18.2	13.8	3.0	18.2	8.6	13.4	15.2	12.9	6.9	12.1

Results are expressed as molar ratios. Values in parentheses are the nearest integers.

The peptide maps of the tryptic digests of calf and rat H2B presented in figure 1 appear quite similar. This similarity strongly suggests a structural identity of the two proteins, which was evidenced by structural studies of the tryptic peptides.

were directly obtained in pure form. Three of them had to be purified by paper chromatography [11].

The amino acid composition and yield of the tryptic peptides are given in table II. Because of

Sequence of rat histone H2B and phosphorylation sites.

incomplete cleavage by trypsin, four peptides (T-3, T-5, T-6 and T-10) are accompanied by one derivative (T-3a, T-5a, T-6a and T-10a).

The complete amino acid sequence of the rat thymus histone H2B (figure 3) was deduced from the structural studies of the tryptic peptides which were ordered by comparison with the amino acid sequence of the calf homologous histone.

Both histones have an identical primary structure.

The radioautography of the peptide map of the tryptic hydrolysate of the phosphorylated histone H2B labelled with [^{32}P] phosphate showed five radioactive spots, one corresponding to inorganic phosphate in excess, three to neutral peptides and one to a basic peptide upon electrophoresis at

The inorganic [^{32}P] phosphate was eluted in fraction 1. The labelled peptides, obtained directly in pure form, were analysed and led us to identify four sites of phosphorylation in the histone H2B (table III).

Partial cleavage by trypsin was observed at the P
 $\begin{array}{c} | \\ \text{Arg}-\text{Ser} \text{ bond, producing peptide T-9a together} \\ \text{31} \quad \text{32} \\ \text{with peptide T-8a. This probably due to the aci-} \\ \text{dic environment introduced by the phosphate} \\ \text{groups.} \end{array}$

The amounts of phosphorylation at Ser-32 (66 per cent) and Ser-36 (26 per cent) represent together 92 per cent of the total amount of phosphate incorporated into the rat histone H2B. On the other hand, Ser-87 and Ser-91 are minor sites of phosphorylation and are equally labelled.

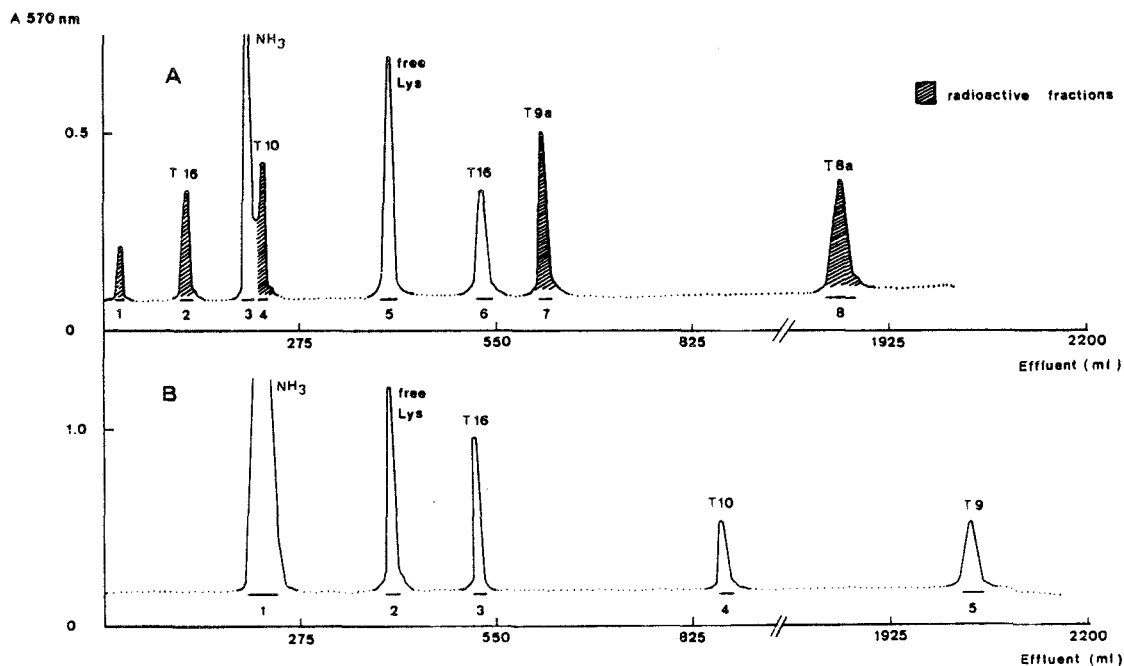


FIG. 4. — Elution diagram of tryptic peptides from histone H2B from rat thymus, fractionated on Chromobeads P column.

A : phosphorylated histone H2B.

B : native histone H2B.

Peptides were designated by the symbol T and numbered as indicated in the legend of figure 1.

pH 3.6. In ion exchange chromatography, these labelled peptides had an elution volume smaller to that of their corresponding unlabelled peptides as shown in figure 4.

BIOCHIMIE, 1979, 61, n° 1.

Ser-32 and Ser-36 are also major sites of phosphorylation in calf histone H2B when cyclic AMP-dependent protein kinase from silkworm pupae [5] or from bovine cerebellum [6] is used.

A. Martinage and coll.

Ser-36 is preferentially phosphorylated with protein kinase from human tonsillar lymphocytes [17] or from pig brain [18].

As pointed out by MacLeod *et al.* [19] and Small *et al.* [20], Ser-32 and Ser-36 are located in predicted β -turn structure. The location of a phos-

TABLE III.
Location of phosphoserine residues in rat thymus histone H2B phosphorylated in vitro with cyclic AMP-dependent protein kinase from rat pancreas.

Peptide	Sequence of tryptic peptide	Sites of phosphorylation
T-8a	P Lys-Arg-Ser-Arg 32	Ser 32
T-9a	P Ser-Arg 32	
T-10	P Glu-Ser-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys 36	Ser 36
T-16	P P Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg 87 91	Ser 87 Ser 91

Thus, the cyclic AMP-dependent protein kinases obtained from various sources do not appear to be species- or tissue-specific.

However, there is some degree of specificity for rat pancreas protein kinase which phosphorylates Ser-87 and Ser-91 and for pig brain protein kinase which phosphorylates Ser-14 [18].

The phosphorylated residues of serine at positions 14, 32, 36 and 87 are located in a sequence B-X-Ser where B is lysine or arginine and X, a basic, neutral or acidic residue [18, 19]. Therefore the phosphorylation of the serine 91 appears to be quite atypical and we cannot discard the possibility of a small contamination of our preparation of cyclic AMP-dependent protein kinase by a different kinase.

If we consider now the position of the major sites of phosphorylation in the amino acid sequence of histone H2B, we can observe that they are located in the amino terminal DNA-binding region of the protein, close to a basic cluster and therefore, the phosphorylation could modulate the electrostatic interactions of the DNA with the histone.

BIOCHIMIE, 1979, 61, n° 1.

phorylated serine in a β -turn is also found in calf histone H2A (Ser-19) and in trout histone H1 (Ser-145, -161, -182 [19]). According to MacLeod *et al.* [19] the protein kinase would recognize preferentially the serine residues thus exposed by this particular conformation.

Acknowledgments.

This work was supported by grant n° 74.5.059.2 from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by the Centre National de la Recherche Scientifique (L.A. n° 268).

We acknowledge with pleasure the skillful technical assistance of Miss A. Hémez and of Mrs. D. Belaïche and M. J. Dupire.

REFERENCES.

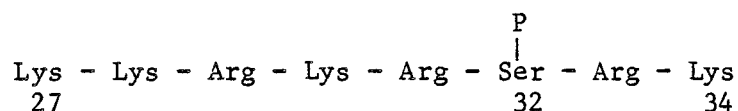
1. Iwai, K., Ishikawa, K. & Hayashi, H. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 37-41.
2. Kootstra, A. & Bailey, G. S. (1976) *FEBS Letters*, **68**, 76-78.
3. Strickland, M., Strickland, W. N., Brandt, W. F. & Von Holt, C. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **77**, 263-275.
4. Strickland, W. N., Strickland, M., Brandt, W. F. & Von Holt, C. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **77**, 277-286.
5. Hashimoto, E., Takeda, M. & Nishizuka, Y.; Hamana, K. & Iwai, K. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 547-555.

Sequence of rat histone H2B and phosphorylation sites.

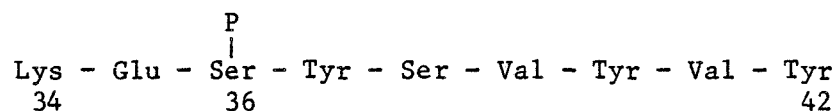
6. Kuroda, Y., Hashimoto, E. & Nishizuka, Y. ; Hamana, K. & Iwai, K. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 629-635.
7. Johns, E. W. (1964) *Biochem. J.*, **92**, 55-59.
8. Martinage, A., Sautière, P., Kerckaert, J. P. & Biserte, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 37-41.
9. Gros, C. & Labouesse, B. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **7**, 463-470.
10. Sautière, P., Breynaert, M. D., Moschetto, Y. & Biserte, G. (1970) *C. R. Acad. Sci. Paris*, **D 271**, 364-365.
11. Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.*, **12**, 222-226.
12. Cohen-Solal, M. & Bernard, J. L. (1973) *J. Chromatog.*, **80**, 140-143.
13. Yamada, S. & Itano, M. A. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 538-540.
14. Cenatiempo, Y., Mangeat, P. & Marchis-Mouren, G. (1975) *Biochimie*, **57**, 865-873.
15. Liu, T. Y., Stein, W. H., Moore, S. & Elliott, S. D. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1143-1149.
16. Bylund, D. B. & Huang, T. S. (1976) *Anal. Biochem.*, **73**, 477-485.
17. Farago, A., Romhányi, T., Antoni, F., Takats, A. & Fabian, F. (1975) *Nature*, **254**, 88.
18. Shlyapnikov, S. V., Arutyunyan, A. A., Kurochkin, S. N., Memelova, L. V., Nesterova, M. V., Sashchenko, L. P. & Severin, E. S. (1975) *FEBS Letters*, **53**, 316-319.
19. MacLeod, A. R., Wong, N. C. W. & Dixon, G. H. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **78**, 281-291.
20. Small, D., Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 341-346.

DISCUSSION

Deux sites majeurs de phosphorylation ont été identifiés dans l'histone H2B de thymus de Rat. Le premier site (sérine 32) est localisé dans un centre basique très important, caractéristique de l'histone H2B :



Cette zone est en interaction avec le DNA et la phosphorylation de la sérine 32 peut moduler cette interaction. Le deuxième site important de phosphorylation (sérine 36) se trouve au bord de la zone hydrophobe qui interagit avec l'histone H2A et plus précisément, ce site de phosphorylation se trouve dans une courte séquence (8 acides aminés) qui renferme trois des cinq résidus de tyrosine présents dans la molécule :



Des études de pontage réalisées par irradiation aux rayons ultraviolets ont montré que l'un de ces trois résidus de tyrosine était impliqué dans l'interaction avec l'histone H2A par l'intermédiaire du résidu de proline en position 26 (DELANGE et coll., 1979). La proximité, dans la structure primaire, du résidu de sérine phosphorylé (sérine 36) et de la zone d'interaction de l'histone H2B avec l'histone H2A laisse cependant ce site accessible à la kinase, ce qui montre bien l'importance de la structure secondaire dans les modifications post-synthétiques comme dans les interactions des protéines.

Les sites de phosphorylation (sérines 32 et 36) ont également été observés par HASHIMOTO et coll. (1975) en phosphorylant l'histone H2B à l'aide d'une kinase activée par l'AMP cyclique et isolée du Ver à soie. Par contre, une kinase également activée par l'AMP cyclique mais isolée de différents tissus du Porc (cerveau : SHLYAPNIKOV et coll., 1975 ; coeur : MARTINAGE, résultats non publiés) modifie la sérine en position 14 dans l'histone H2B.

Quoi qu'il en soit, ces sites de phosphorylation sont tous localisés dans une séquence code reconnue par la kinase, de type B - X - Ser^P où B est un acide aminé basique (lysine ou arginine) et X tout acide aminé sauf la proline.

IV - 1-2 Phosphorylation des histones individuelles H5, H2A
et du dimère H2A-H2B : Publication 4.

La deuxième étape de notre collaboration avec le Professeur G.MARCHIS-MOUREN et avec le Docteur P.MANGEAT fut consacrée à l'étude de la phosphorylation d'histones qui s'étaient révélées être de bons substrats pour la sous-unité catalytique de la kinase de pancréas de Rat : les histones H5 et H2A (Voir étude cinétique d'incorporation de phosphate [³²P] dans les histones, figure 17 page 170).

Pour cette étude c'est l'histone H2A isolée de la tumeur chloroleucémique du Rat qui a servi de substrat. Cette histone présente un polymorphisme en particulier à la position 16 où un résidu de sérine remplace un résidu de thréonine par rapport à l'histone H2A de thymus de Veau. Ce variant H2A- α représente 60 p.100 de l'histone H2A totale de chloroleucémie.

Curieusement, l'histone H1 qui présente une étroite parenté structurale avec l'histone H5, est moins activement phosphorylée par la kinase que l'histone H5. Toutefois, ceci est en accord avec les travaux de LANGAN (1978) qui identifiait un seul site de phosphorylation (sérine 37) dans l'histone H1 phosphorylée en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique. La connaissance de la structure primaire étant indispensable pour localiser les sites de phosphorylation, l'histone H1 n'a pas fait l'objet de nos investigations. Par contre,

nous avons étudié la phosphorylation de l'histone H5, histone spécifique des érythrocytes nucléés, dont la structure primaire a été déterminée dans notre laboratoire (BRIAND et coll., 1980). Cette histone rapidement phosphorylée après sa synthèse, est déphosphorylée dans l'érythrocyte mature lorsque la chromatine atteint son plus haut niveau de condensation. Localisée à l'extérieur de la "core particle", l'histone H5 peut moduler par sa phosphorylation son interaction avec le nucléosome.

La phosphorylation des histones individuelles constitue un moyen pour aborder l'étude de la modification des histones au sein des complexes formés par leurs interactions. Nous avons vu plus haut que l'un des sites de phosphorylation de l'histone H2B est localisée au bord de la zone d'interaction avec l'histone H2A ; il nous a donc paru intéressant de rechercher si, dans le dimère H2A-H2B, les zones d'interaction histone-histone laissent les sites de phosphorylation accessibles à la kinase.

IN VITRO PHOSPHORYLATION OF HISTONES H5, H2A, H2B AND OF THE DIMER H2A-H2B BY A CYCLIC AMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE FROM RAT PANCREAS

A. MARTINAGE, P. MANGEAT⁺, B. LAINE, M. COUPEZ, P. SAUTIERE, G. MARCHIS-MOUREN⁺ and G. BISERTE

Unité 124 de l'INSERM et Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, BP 3567, 59020 Lille Cédex and ⁺Institut de Chimie Biologique, Université d'Aix-Marseille, Place Victor Hugo 13331 Marseille, France

Received 19 June 1980

1. Introduction

Histone phosphorylation is a post-synthetic modification involved in the regulation of metabolic process and genetic expression [1,2] and associated with changes in chromatin structure [3].

All histones are phosphorylated but lysine-rich histones are the most active substrates for cyclic AMP-dependent protein kinases [4]. Phosphorylation of lysine-rich histone (H1) has been correlated with the rate of cell division in different rat and mouse tumors [5]. Phosphorylation is more extensive in rapidly growing cells than in non-dividing tissue. Phosphorylation is also related to cell maturation, for example, to erythrocyte maturation [6] during which time histone H5 is synthesized.

The phosphorylation of the histones with protein kinases isolated from different mammalian tissues: brain, liver, testis and thymus, takes place at specific sites of the amino acid sequences, generally located in highly basic regions which are major sites of interaction with DNA [7]. Therefore phosphorylation can modulate the histone-DNA interactions.

This paper deals with the in vitro phosphorylation of histones by a cyclic AMP-dependent protein kinase isolated from rat pancreas. Histones from various sources were used: H2B from rat thymus, H2A (variant α) from rat chloroleukemia; the complex H2A-H2B from calf thymus; H5 from chicken erythrocyte.

In rat chloroleukemia, histone H2A exhibits a polymorphism depending on the nature of the amino acid residues at positions 16 and 99 [8]. Three molecular species of H2A were identified in this tumoral

tissue: H2A- α (serine 16 and lysine 99); H2A- β 1 (threonine 16 and arginine 99); H2A- β 2 (serine 16 and arginine 99). The variant α which accounts for 60% of the total H2A is of special interest because of a potential site of phosphorylation at serine residue in position 16.

On the other hand, the dimer H2A-H2B is known to be a constitutive element of the nucleosome [9] in the chromatin structure. It was therefore attractive to determine if the sites of phosphorylation were identical in the complex and in the individual histones.

The phosphorylated histones were hydrolysed with trypsin. The ³²P-labelled peptides were isolated and the sites of phosphorylation determined. Four sites of phosphorylation were identified in rat thymus histone H2B: two major, at serine residues 32 and 36, and two minor, at serine residues 87 and 91 [10].

Two sites of phosphorylation were identified in rat chloroleukemia histone H2A- α at serine residues 1 and 19. The serine residue at position 16 was not phosphorylated.

Since sequences of rat and calf histones H2A differ only by one conservative change at position 16 [8] Ser (rat) \rightarrow Thr (calf) which is not a phosphorylation site and since rat and calf histones H2B have identical primary structures [10], the histone complex H2A-H2B was prepared from calf thymus chromatin in order to get a larger amount of substrate for our phosphorylation experiments.

When the dimer H2A-H2B was assayed, phosphorylation took place at the same serine residues and to the same extent as in the isolated histones.

In chicken erythrocyte histone H5, four phosphorylated sites were identified: at serine residues 22, 29, 145 and 166 [11].

Abbreviation: TPCK, Tos-Phe CH₂Cl, *N*-tosyl phenylalanine chloromethyl ketone

The major phosphorylation sites in all the assayed histones are generally located within predicted β -turns [12,13] and in the basic region of the proteins, which is involved in electrostatic interactions with the phosphate groups of the DNA.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of ^{32}P -labelled histones

The variant α of rat chloroleukemia histone H2A was obtained by ion-exchange chromatography on Biorex 70 as in [8].

Rat thymus histone H2B was isolated by preparative electrophoresis on polyacrylamide slab gel [14]. The calf histone complex H2A-H2B was isolated from histone fraction F2b [15] by ion-exchange chromatography on Biorex 70 as in [16].

Chicken erythrocyte histone H5 was prepared as in [17].

Histones were phosphorylated by a cyclic AMP-dependent protein kinase isolated from rat pancreas. The catalytic subunit of this protein kinase was obtained, in a highly purified state by chromatography on CM-Sephadex [18].

About 20 mg of each histone (H2A- α , H2B, H5) and 40 mg of the dimer H2A-H2B were dissolved in 30 mM Tris-HCl (pH 7.8) containing 12 mM MgCl_2 ; histone was 0.5 mg/ml. The mixture was then incubated for 24 h at 30°C with the purified enzyme (1-1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of 0.4 mM [γ - ^{32}P]ATP. The presence of an equimolar histone complex in these experimental conditions was assessed by circular dichroism spectroscopy (fig.1). Incubation was stopped by cooling (4°C) and the incubate was dialyzed against deionized water (2 \times 3 l) for 18 h and lyophilized.

2.2. Enzymatic cleavages of labelled histones and identification of the phosphorylation sites

Tryptic hydrolysis: ^{32}P -labelled histones and dimer H2A-H2B were hydrolyzed for 2 h at pH 8.0 and 37°C in 0.1 M *N*-methyl morpholine with TPCK-treated trypsin (Worthington) using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50 (w/w). The hydrolysis was stopped by lowering to pH 3.5 with formic acid.

Pepsin cleavage of histone H5: Alternatively, the phosphorylated histone H5 was dissolved in 5% formic acid and hydrolyzed for 2 h at 37°C with pepsin using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50

(w/w) [11]. Hydrolysis was stopped by freezing. Fractionation of peptic peptides was performed on Sephadex G-50 fine (column 150 \times 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl. The C-terminal peptide (peptide Px, 96 residues) was isolated and submitted to tryptic hydrolysis as above.

An aliquot was taken from each hydrolysate for peptide mapping on Whatman 3 MM paper as in [19].

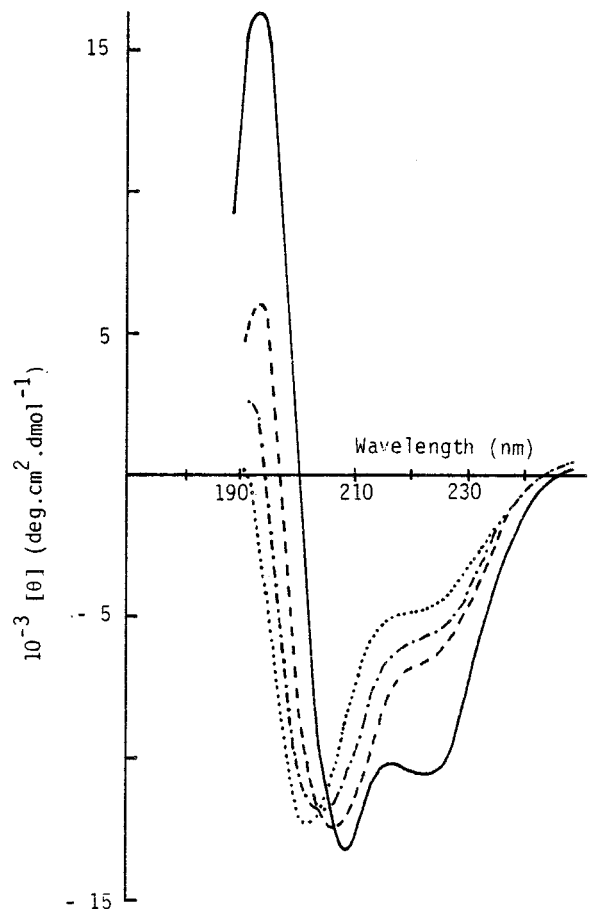


Fig.1. Circular dichroism spectra of calf thymus histones H2A (—), H2B (· · ·), of a hypothetical non-interacting equimolar H2A/H2B mixture (---) and of the dimer H2A-H2B (— — —). Histones and dimer were dissolved in 30 mM Tris-HCl (pH 7.8) containing 12 mM MgCl_2 in the presence of 0.4 mM ATP. Histone was 0.5 mg/ml and measurements were made using a Jobin-Yvon dichrograph R. J. Mark III with a 0.1 mm pathlength cell. The dichroism spectrum of the dimer H2A-H2B is characteristic of a true complex namely by the $[\theta]_{222}$ value which accounts for -10650° . This value agrees with that of -11700° found [30] for the dimer H2A-H2B in 25 mM potassium phosphate (pH 7.0).

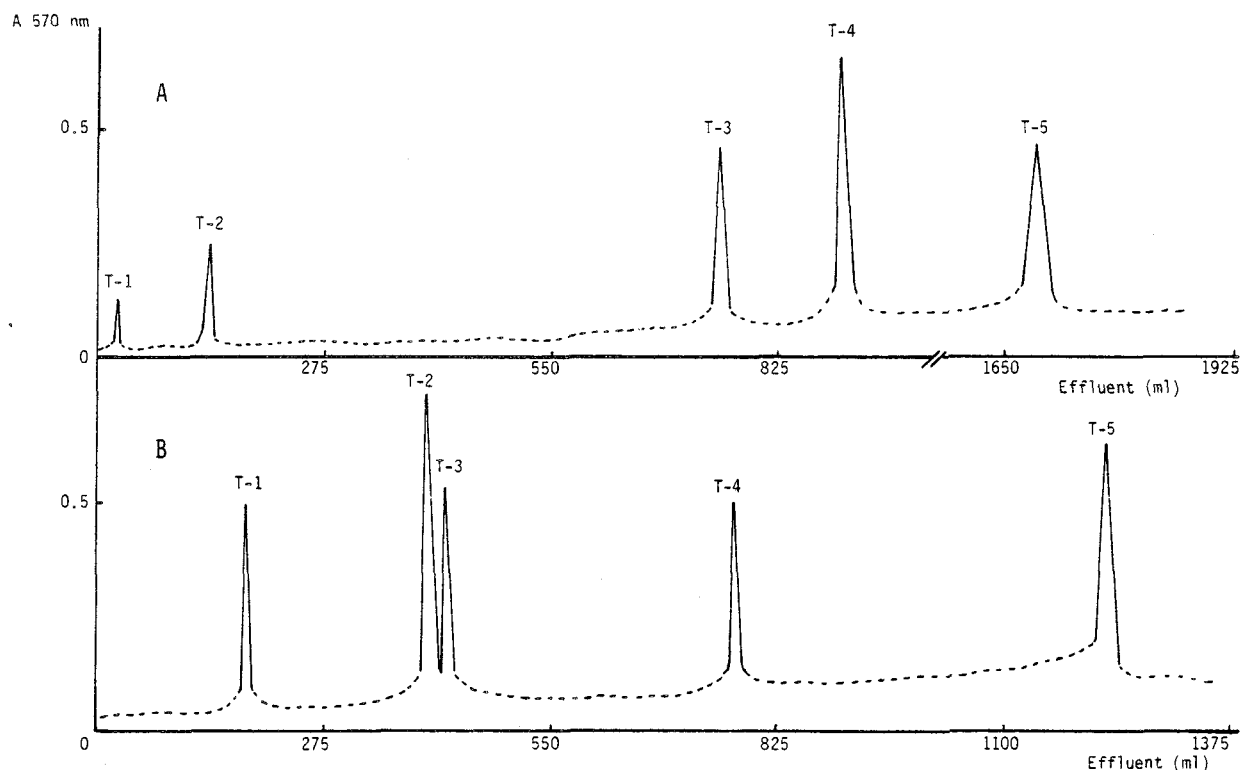


Fig.2. Elution diagrams of phosphorylated tryptic peptides, fractionated on a Chromobeads P column. Peptides were eluted with pyridine-formate and pyridine-acetate buffers used in a pyridine concentration and pH gradient [20]. Peptides were designated by the symbol T and numbered according to their elution volume of the Chromobeads P column. (A) Phosphorylated complex H2A-H2B; (B) phosphorylated histone H5.

The tryptic hydrolysates were fractionated by ion exchange chromatography on a Chromobeads P column with pyridine formate and pyridine acetate buffers [20]. Fractions of 5.5 ml were collected at 33 ml/h flowrate. Elution of the peptides was monitored automatically by ninhydrin reaction. The Sakaguchi reaction was specifically used for the detection of the amino terminal peptide *N*-acetyl-Ser-Gly-Arg of histone H2A.

Fractions containing peptides were pooled, evaporated and taken into 1 ml 10% acetic acid. The radioactivity was then measured on an aliquot (5 μ l) of each peptidic fraction after adding 2 ml Bray solution [21]. Fig.2 shows the elution diagrams of phosphorylated tryptic peptides from the dimer H2A-H2B (A) and from histone H5 (B).

The radioactive peptides were located on tryptic fingerprints by radioautography, using Kodirex film (Kodak). When necessary, purification of peptides was achieved by preparative paper chromatography or

paper electrophoresis as in [19].

Amino acid composition of each phosphopeptide was determined after hydrolysis in 6 M HCl for 24 h at 110°C under vacuum. Under these conditions, the *O*-ester linkage was completely hydrolyzed [22].

The phosphorylated sites were identified by sequencing the phosphopeptides by manual Edman degradation and measuring the radioactivity after each cycle involving the elimination of a serine residue.

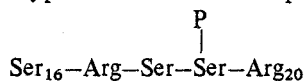
3. Results and discussion

The radioautography of the peptide map of the tryptic hydrolysate of the individual histones and of the dimer H2A-H2B labelled with [32 P]phosphate showed 2 labelled peptides in histone H2A- α , 4 in histone H2B and 5 in the complex H2A-H2B and in histone H5.

Structural studies of the phosphorylated tryptic

peptides isolated by chromatography on Dowex-50 allowed us to identify the sites of phosphorylation in each protein (table 1).

Two serine residues (Ser₁ and Ser₁₉) were phosphorylated in rat chloroleukemia histone H2A- α . The presence of a phosphate group on Ser₁₉ completely inhibits the cleavage of the Arg₁₇-Ser₁₈ bond by trypsin and results in the peptide:



We must emphasize that the change Thr \rightarrow Ser at position 16 of the amino acid sequence of rat histone H2A by comparison with the homologous calf histone, does not introduce a third site of phosphorylation in histone H2A.

Ser₁ was also found phosphorylated in vivo in trout testis [23] and rat liver [24] histone H2A.

On the other hand, Ser₁₉ was the only site of in vitro phosphorylation identified in calf thymus histone H2A phosphorylated with the catalytic subunit of the cyclic AMP-dependent histone kinase isolated from pig brain [25].

Four sites of phosphorylation were identified in rat thymus histone H2B: Ser₃₂ and Ser₃₆ as major sites; Ser₈₇ and Ser₉₁ as minor sites [10]. The incom-

plete cleavage by trypsin of the bond Arg₃₁-Ser₃₂

generated peptide Lys₃₀-Arg-Ser-Arg₃₃ together

with peptide Ser₃₂-Arg₃₃ and consequently accounted for the presence of two radioactive spots corresponding to [³²P]Ser₃₂ on the peptide map of histone H2B.

When the dimer H2A-H2B was phosphorylated, the presence of a true dimer in the experimental conditions of phosphorylation was ascertained by circular dichroism spectroscopy (fig.1). Increase of α -helix content typical of histone-histone interaction is seen at 222 nm by comparison with individual histone spectra.

In the dimer H2A-H2B, the sites of phosphorylation were found identical to those determined in the individual histones. These sites are located outside or at the edge of the structured apolar regions (18-127 of H2A and 32-125 of H2B) which strongly interact together to form the histone com-

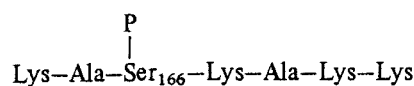
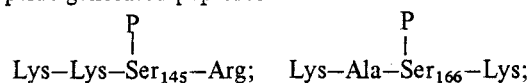
plex H2A-H2B (M. C., unpublished). The highly basic N-terminal regions of H2A and H2B are not involved in dimer formation and are major sites of interaction of DNA.

Clearly, the phosphorylation sites of H2A and H2B are still accessible to the kinase when H2A and H2B interact together.

Five radioactive peptides were identified in the tryptic hydrolysate of chicken erythrocyte histone H5. One peptide corresponding to the sequence 22-37 of the protein contained two sites of phosphorylation (Ser₂₂ and Ser₂₉). The third serine residue present in the peptide at position 24 was not phosphorylated. The amount of radioactivity measured in this peptide represents ~20% of the total labelling of the protein. The remainder of the radioactivity is equally distributed between Ser₁₄₅ and Ser₁₆₆ in the highly basic C-terminal half of the histone H5.

Due to incomplete cleavage by trypsin of the susceptible bonds adjacent to the phosphorylated sites, the labelled Ser₁₄₅ and Ser₁₆₆ were each identified in two different peptides (table 1). However, since the peptide Ser-Arg can be generated by tryptic hydrolysis of the Lys-Ser bond present 3 times in the amino acid sequence of histone H5 (residues 40-42; residues 144-146; residues 161-163), it was necessary to ascertain the position of the

peptide Ser-Arg in the sequence of the protein. Phosphorylated histone H5 was therefore hydrolysed by pepsin in order to yield the C-terminal half of the protein (residues 94-189) by specific cleavage of the Phe₉₃-Arg₉₄ bond. The tryptic digestion of this peptide generated peptides:



No peptide Ser-Arg was found in the tryptic digest of the peptic peptides originating from the amino-terminal half of the histone H5.

The sites of phosphorylation of chicken histone H5 identified here are different from those found in the homologous protein from pigeon erythrocyte [26]. The in vitro phosphorylation of pigeon histone

H5 with a pig brain protein kinase occurred at Ser₄₅ (or Ser₄₆), Ser₄₉, Ser₉₁ (or Ser₉₂) and at a serine or threonine residue in the carboxy-terminal half of the molecule. The protein kinase from pig brain seems therefore to have a specificity different from that of the protein kinase from rat pancreas. This difference of specificity has already been pointed out in the phosphorylation of histone H2B [10].

However, the *in vitro* phosphorylation sites of histone H5 are different from those of the *in vivo* phosphorylation [27]. *In vivo*, Ser₃ and Ser₇ are strongly ³²P-labelled to the same specific activity. In the carboxy-terminal part of the molecule (residues 121–189), the two serine residues phosphorylated *in vivo* have not been identified with certainty but they appear to be different from the *in vitro* sites (Ser₁₄₅ and Ser₁₆₆).

Our results show that the phosphorylation of histone H5 occurs mainly in the strongly basic carboxy-terminal region of the molecule where 80% of the total amount of radioactivity are incorporated. The remaining ³²P-label is found in the slightly basic N-terminal part of the molecule at the edge of the globular region of the protein (residues 23–99) [28].

However, even if the specificity is different from one kinase to another, the sites of phosphorylation in histone H5 are distributed *in vitro* or *in vivo*, in two distinct regions of the protein: the basic carboxy-terminal region and the apolar amino-terminal region.

Phosphorylation of the histones H2A, H2B and H5 by the cyclic AMP-dependent protein kinase isolated from rat pancreas occurs generally on serine residue located in a sequence B–X–Ser where B is Lys or Arg and X any amino acid (table 1). However, phosphorylation of Ser₁ in H2A, Ser₉₁ in H2B and Ser₂₉ in H5 does not meet with this code, but it must be stated that Ser₉₁ in H2B and Ser₂₉ in H5 are minor phosphorylation sites. The phosphorylated Ser₃₂ in H2B and Ser₁₄₅ in H5 on the one hand and Ser₁₉ in H2A and Ser₁₆₆ in H5, on the other hand, are located in strongly homologous sequences, respectively.

The recognition of specific amino acid sequences by the protein kinase is completed by that of a specific secondary structure. Indeed, all the phosphorylation sites are located within regions predicted as β -turns [12,13].

Phosphorylation essentially takes place in the highly basic regions of the histones involved in electrostatic interactions with the phosphate groups of DNA. The 3 minor sites (Ser₈₇ and Ser₉₁ in H2B,

and Ser₂₉ in H5) which are located inside the structured apolar regions of the proteins [28,29], are brought to the surface of the protein by a β -turn structure and therefore are accessible to the protein kinase [13]. The major sites of phosphorylation are placed outside the organised apolar regions of the proteins [29].

The fact that Ser₁ and Ser₁₉ in H2A and Ser₃₂ and Ser₃₆ in H2B are phosphorylated in the histone complex H2A–H2B is in conformity with that determination.

Acknowledgements

We acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of Mrs D. Bélaïche and M. J. Dupire and of Miss A. Hémez. We thank Dr A. Mazen for providing us with histone H5 and Dr M. H. Loucheux for giving us access to CD spectrophotometer. This work was supported by grant 77.5.048.2 from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by grants ATP 2875 and LA 268 from the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- [1] Huijting, F. and Lee, E. Y. C. (1973) Protein phosphorylation in control mechanisms, Academic Press, New York.
- [2] Jungmann, R. A. and Kranias, E. G. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 819–830.
- [3] Gurley, L. R., D'Anna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L. and Tobey, R. A. (1978) *Eur. J. Biochem.* 84, 1–15.
- [4] Johnson, J. D., Douvas, A. S. and Bonner, J. (1974) *Int. Rev. Cytol. suppl.* 4, 273–361.
- [5] Balhorn, R., Balhorn, M., Morris, H. P. and Chalkley, R. (1972) *Cancer Res.* 32, 1775–1784.
- [6] Mazen, A. and Champagne, M. (1972) *Biochimie* 54, 1273–1279.
- [7] Williams, R. E. (1976) *Science* 192, 473–474.
- [8] Laine, B., Sautière, P. and Biserte, G. (1976) *Biochemistry* 15, 1640–1645.
- [9] Thomas, J. O. and Kornberg, R. D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2626–2630.
- [10] Martinage, A., Mangeat, P., Sautière, P., Marchis-Mouren, G. and Biserte, G. (1979) *Biochimie* 61, 61–69.
- [11] Briand, G., Kmiecik, D., Sautière, P., Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. and Champagne, M. (1980) *FEBS Lett.* 112, 147–151.
- [12] MacLeod, A. R., Wong, N. C. W. and Dixon, G. H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 78, 281–291.

- [13] Small, D., Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 341-346.
- [14] Martinage, A., Sautière, P., Kerckaert, J. P. and Biserte, G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 420, 37-41.
- [15] Johns, E. W. (1964) *Biochem. J.* 92, 55-59.
- [16] Skandrani, E., Mizon, J., Sautière, P. and Biserte, G. (1972) *Biochimie* 54, 1267-1272.
- [17] Champagne, M., Mazen, A. and Wilhelm, X. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1261-1272.
- [18] Mangeat, P., Chahinian, H. and Marchis-Mouren, G. (1978) *Biochimie* 60, 777-785.
- [19] Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 222-226.
- [20] Sautière, P., Breynaert, M. D., Moschetto, Y. and Biserte, G. (1970) *CR Acad. Sci. Paris*, D271, 364-365.
- [21] Bray, G. A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285.
- [22] Bylund, D. B. and Huang, T. S. (1976) *Anal. Biochem.* 73, 477-485.
- [23] Sung, M. T. and Dixon, G. H. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1616-1623.
- [24] Sung, M. T., Dixon, G. H. and Smithies, O. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1358-1364.
- [25] Shlyapnikov, S. V., Arutyunyan, A. A., Kurochkin, S. N., Memelova, L. V., Nesterova, M. V., Saschenko, L. P. and Severin, E. S. (1975) *FEBS Lett.* 53, 316-319.
- [26] Kurochkin, S. N., Andreeva, N. B., Gasaryan, K. A. and Severin, E. S. (1977) *FEBS Lett.* 76, 112-114.
- [27] Sung, M. T. and Freedlender, E. F. (1978) *Biochemistry* 17, 1884-1890.
- [28] Aviles, F. J., Chapman, G. E., Kneale, G. G., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E. M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 88, 363-371.
- [29] Bradbury, E. M. (1978) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 283, 291-293.
- [30] Moss, T., Cary, P. D., Abercrombie, B. A., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E. M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 71, 337-350.

DISCUSSION

Les sites de phosphorylation ont été localisés dans la séquence de l'histone H5. Sur les 26 résidus de sérine que renferme une molécule d'histone H5, quatre sont phosphorylés (résidus de sérine aux positions 22, 29, 145 et 166). Deux résidus de sérine modifiés sont localisés dans la région C-terminale très basique tandis que les deux autres (qui correspondent à des sites mineurs, il est vrai) sont situés au bord du domaine hydrophobe de la molécule (résidus 22 à 99). Ces sites sont spécifiques de la kinase de pancréas de Rat. En effet, une kinase isolée du cerveau de Porc (KUROCHKIN et coll., 1977) phosphoryle l'histone H5 en quatre sites dont trois sont situés dans la zone hydrophobe (sérines 45, 49 et 91) et un dans la zone C-terminale basique. La différence de spécificité des deux enzymes (kinase de pancréas de Rat et kinase de cerveau de Porc) a déjà été soulignée pour l'histone H2B.

Les sites de phosphorylation localisés *in vitro* dans l'histone H5 en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique sont différents de ceux identifiés *in vivo* par SUNG et FREEDLENDER (1978). Ces auteurs ont localisé 50 p.100 de la radioactivité dans la zone N-terminale (sérines 3 et 7) de la protéine lui conférant ainsi un caractère très acide qui pourrait empêcher, par l'intermédiaire des répulsions électrostatiques, la condensation de la chromatine. Ceci est en accord avec le fait que l'histone H5 est activement phosphorylée dans l'érythroblaste où la chromatine n'est pas condensée tandis que la phosphorylation de l'histone H5 diminue et la chromatine se condense au cours de la maturation de l'érythrocyte.

L'histone H2A de tumeur de chloroleucémie du Rat est phosphorylée en deux sites (sérines 1 et 19). La mutation Thr→Ser en position 16 observée dans le variant H2A-a n'introduit pas un troisième site de phosphorylation dans la molécule. La phosphorylation du résidu de N-acétyl sérine a déjà été observée *in vivo* dans le foie de Rat en régénération (SUNG et coll., 1971). Par ailleurs, la phosphorylation de l'histone H2A a été reliée à la condensation de la chromatine (GURLEY et WALTERS, 1973); ainsi, dans l'érythrocyte nucléé du Ver marin, *Sipunculus nudus*, KMIECIK et coll. (1983) ont montré que 60 p.100 des molécules de H2A étaient phosphorylées *in vivo* sur le résidu de sérine en position 1. Cette phosphorylation physiologique intense n'avait jamais été observée précédemment.

Les deux sites de phosphorylation de l'histone H2A de tumeur de chloroleucémie du Rat sont localisés dans la région N-terminale basique d'interaction avec le DNA ; la sérine modifiée en position 19 est située juste avant une zone hautement conservée au cours de l'évolution et qui interagit avec l'histone H2B (zone 21 à 29).

Lorsque l'histone H2A interagit avec l'histone H2B pour former le dimère H2A-H2B, partie intégrante du nucleosome, les sites de phosphorylation sont identiques à ceux qui ont été identifiés dans chaque histone isolée. Deux sites (sérine 1 de H2A et sérine 32 de H2B) sont localisés dans la région N-terminale basique des histones H2A et H2B, régions laissées libres de toute interaction après formation du dimère. Les deux autres sites (sérine 19 de H2A et sérine 36 de H2B) sont situés à la limite de la région N-terminale basique et de la région structurée apolaire, région impliquée dans l'interaction des histones H2A et H2B.

En conclusion, les sites de phosphorylation des histones H2A et H2B sont encore accessibles à la kinase lorsque ces histones interagissent pour former le dimère H2A-H2B.

IV - 1-3 Phosphorylation des histones H3,H4. Importance de
l'interaction des histones H3-H4 : phosphorylation
des tétramères (H3-H4)₂ non-acétylé et acétylé.

Publication 5

L'étude cinétique d'incorporation du phosphate $[^{32}\text{P}]$ dans les histones H3 et H4 (figure 17, page 170) ne nous encourageait pas à pousser plus loin nos travaux dans ce domaine : en effet, après 24 heures d'incubation, l'histone H3 était peu phosphorylée tandis que l'histone H4 ne l'était pas du tout. Cependant, ces histones dont la structure est pratiquement invariable au cours de l'évolution (à quelques exceptions près chez les Eucaryotes inférieurs) sont les plus modifiées par acétylation et méthylation et malgré la faible incorporation de phosphate $[^{32}\text{P}]$ dans l'histone H3, nous avons recherché le (ou les) site(s) de phosphorylation dans cette histone.

L'absence d'incorporation de phosphate $[^{32}\text{P}]$ dans l'histone H4 est surprenante car cette histone présente une séquence N-terminale (résidus 1 à 5) identique à celle de l'histone H2A qui est phosphorylée sur le résidu d'acétylsérine en position 1. Nous avons alors mesuré l'incorporation de phosphate $[^{32}\text{P}]$ dans le tétramère (H3-H4)₂ et nous avons constaté avec surprise que le tétramère (H3-H4)₂ incorporait beaucoup plus de phosphate que la somme de chaque histone (Figure 1 de la publication 5).

De plus, l'autoradiographie de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide du tétramère révélait que, dans le complexe, l'histone H4 était un meilleur substrat pour la kinase que l'histone H3.

Par ailleurs, il a été montré qu'une acétylation importante de l'histone H3 après traitement des cellules au butyrate favorise la phosphorylation de cette histone en présence de Ca^{++} à concentration physiologique (WHITLOCK et coll., 1980). Cette observation nous a incitée à étudier l'effet de l'acétylation sur l'incorporation du phosphate dans le tétramère $(\text{H3-H4})_2$ acétylé. Les différentes formes acétylées du tétramère $(\text{H3-H4})_2$ sont obtenues par chromatographie d'échange d'ions sur Amberlite IRC 50 (M. COUPPEZ, résultats non publiés). L'étude cinétique d'incorporation du phosphate $[^{32}\text{P}]$ a été réalisée parallèlement sur le tétramère non-acétylé et sur le tétramère acétylé où l'histone H4 est totalement acétylée sur le résidu de lysine en position 16 et l'histone H3 partiellement acétylée (0,55 mole de ϵ -acétyllysine/mole d'histone H3) aux positions 14 et 23.

STUDY OF IN VITRO PHOSPHORYLATION OF HISTONES H3, H4 AND OF THE NON-ACETYLATED AND ACETYLATED TETRAMERS (H3-H4)₂

A. MARTINAGE, P. MANGEAT*, P. SAUTIERE, M. COUPPEZ, G. MARCHIS-MOUREN* and G. BISERTE
*Unité 124 de l'INSERM et Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59000 Lille and *Institut de Chimie Biologique, Université d'Aix-Marseille, Place Victor Hugo, 13331 Marseille Cédex 03, France*

Received 8 August 1981; revision received 15 September 1981

1. Introduction

The structures of the arginine-rich histones H3 and H4 which have been highly conserved during evolution, can be extensively modified by acetylation, methylation and phosphorylation [1].

Methylation is an irreversible post-synthetic modification which affects two lysine residues at positions 9 and 27 in histone H3 [2] and one lysine residue at position 20 in histone H4 [3].

Acetylation and phosphorylation are two post-synthetic reversible modifications of considerable interest which alter the charge of modified residues and thus modulate the histone-DNA interactions.

The acetylated lysines are at positions 14 and 23 in histone H3 [2] and at positions 5, 8, 12 and 16 in histone H4 [3].

If methylation and acetylation mainly affect histones H3 and H4, phosphorylation is generally related to histones H1, H2B and H2A which are the best substrates for kinases. Therefore, little is known about sites of phosphorylation of histones H3 and H4. The occurrence of phosphoserine in histone H3 from calf thymus has been reported in [4] and phosphorylation of histones H3 and H4 from trout testis has been pointed out in [5]. Histone H3 has been described as the best substrate with histone H2B, for the protein kinase from rabbit skeletal muscle [6]. Moreover, a cAMP-independent H3-specific histone kinase from bovine thymus chromatin has been reported to phosphorylate the threonine residue at position 3 [7].

Histones H3 and H4 are known to interact by structured apolar carboxyl regions (42-120 in H3 and 38-102 in H4) [8,9] to form a tetramer (H3-H4)₂ [10]. We have assumed that in the experimental conditions of phosphorylation, the equimolar com-

plex (H3-H4) was a tetramer. This chromatin subunit structure can induce a phosphorylation specificity of the histones: thus, in the core particle, histone H3 is preferentially phosphorylated to a high degree (~65% of the total phosphate incorporated) by a protein kinase from rabbit skeletal muscle [6]. On the other hand, phosphorylation strongly reduces the association constants of the complex (H3-H4)₂ [11] and in this complex, basic N-terminal regions of histones where post-synthetic modifications are generally observed, are not involved.

This paper deals with in vitro phosphorylation of the calf thymus histones H3 and H4 and of the histone complex (H3-H4)₂ by a cAMP-dependent protein kinase from rat pancreas. This kinase was shown to phosphorylate only serine residues [12].

In comparison with lysine-rich histones, H4 does not incorporate any [³²P]phosphate and H3 is a poor substrate for this protein kinase [13]. In histone H3, one phosphoserine residue at position 10 has been identified. Surprisingly, the tetramer (H3-H4)₂ incorporates [³²P]phosphate more than the sum of each histone. Indeed, in the complex, H4 was a better substrate for the kinase than histone H3 and was phosphorylated on serine residue 47, whereas the phosphorylation of histone H3 takes place at the same serine residue as in the individual histone.

On the other hand, since extensive acetylation of histone H3 after Na-butyrate treatment stimulates its susceptibility to phosphorylation in presence of Ca²⁺ at physiological concentrations [14], it was of interest to investigate if the amount of incorporated [³²P]-phosphate was increased in the acetylated tetramer. Results show that the rate of phosphorylation of histones H3 and H4 was identical in the non-acetylated and acetylated (H3-H4)₂ complexes.

2. Materials and methods

Histone H4 was prepared as in [15,16]. Histone H3 and the non-acetylated and acetylated tetramers (H3-H4)₂ were isolated by ion-exchange chromatography (M.C., unpublished). We define as non-acetylated tetramer (H3-H4)₂ a complex in which histone H4 is non-acetylated and histone H3 partially acetylated (~20 nmol ϵ -acetyllysine/100 nmol H3); the acetylated tetramer is a complex in which histone H4 is fully acetylated on lysine residue at position 16 and histone H3 partially acetylated (~55 nmol ϵ -acetyllysine/100 nmol H3). It must be recalled that two sites of acetylation have been identified in calf thymus histone H3 at positions 14 and 23 [2].

Histones H3 and H4 and the non-acetylated and acetylated (H3-H4)₂ complexes were dissolved at 1 mg/ml, in the phosphorylation buffer containing 30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 12 mM MgCl₂ and 1 mM dithiothreitol.

Individual histones and the (H3-H4)₂ complexes were phosphorylated by a cAMP-dependent protein kinase isolated from rat pancreas as in [12] but at 0.2–0.3 μ g enzyme/ml in the presence of 0.4 mM [γ -³²P]ATP (10 Ci/mmol) prepared as in [17].

The presence of an equimolar complex (H3-H4) in the experimental conditions of phosphorylation was assessed by circular dichroism spectroscopy. Increase of α -helix content typical of histone-histone interaction is seen at 222 nm by comparison with individual histone spectra (not shown).

Electrophoresis of native and phosphorylated histones H3, H4 and of non-acetylated and acetylated complexes (H3-H4)₂ was performed on polyacrylamide (17%) slab gel (14 × 14 × 0.15 cm) at pH 2.7, in 2.5 M urea [18] for 6 h at 10 mA/slab.

Tryptic hydrolysis of labelled histones and complexes and identification of the phosphorylated sites were performed as in [12].

3. Results and discussion

The kinetic study of the phosphate incorporation into individual histones and histones complexes in the presence of the catalytic subunit of a cAMP-dependent histone kinase from rat pancreas is shown in fig.1.

Histone H3 was slightly phosphorylated whereas histone H4 was ineffective as acceptor and very poorly phosphorylated. In the (H3-H4)₂ complex, the [³²P]-phosphate incorporation is higher than the sum of ³²P incorporated in individual histones. Both non-

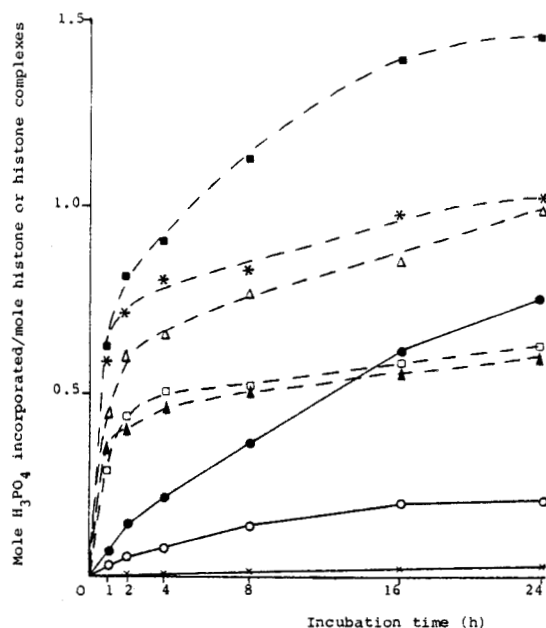


Fig.1. Kinetics of [³²P]phosphate incorporation into individual histones and histone complexes. The phosphorylation reaction by the catalytic subunit of the rat pancreas protein kinase was done as in [12] with different incubation times. [³²P]-Phosphate incorporation for: H4 (x); H3 (o); non-acetylated and acetylated tetramers (H3-H4)₂ (●); H1 (Δ); chicken erythrocyte H5 (△); H2A (□); H2B (*); dimer H2A-H2B (■).

acetylated and acetylated complexes gave the same kinetic curves of [³²P]phosphate incorporation.

Histones H1 and H2A were found equally phosphorylated to a higher extent than histones H3 and H4 but histones H2B and H5 were indeed the best substrates for the cAMP-dependent protein kinase.

In contrast with the tetrameric complex (H3-H4)₂, the dimer H2A-H2B incorporates an amount of ³²P approximately equal to the sum of ³²P incorporated by individual histones H2A and H2B.

Fig.2 shows the analytical gel electrophoreses of histones H3 and H4 and of their complexes, before and after ³²P-labelling. By comparison of the stained gel (fig.2A) and of the autoradiogram (fig.2B), it is obvious that individual histone H3 was phosphorylated whereas individual histone H4 was not. In contrast to this, both histones were found phosphorylated in the complexes. These results corroborate the kinetic studies of the [³²P]phosphate incorporation.

Autoradiography of the peptide map of the tryptic hydrolysate of the tetramers (H3-H4)₂ labelled with [³²P]_iphosphate showed 3 weakly radioactive spots,

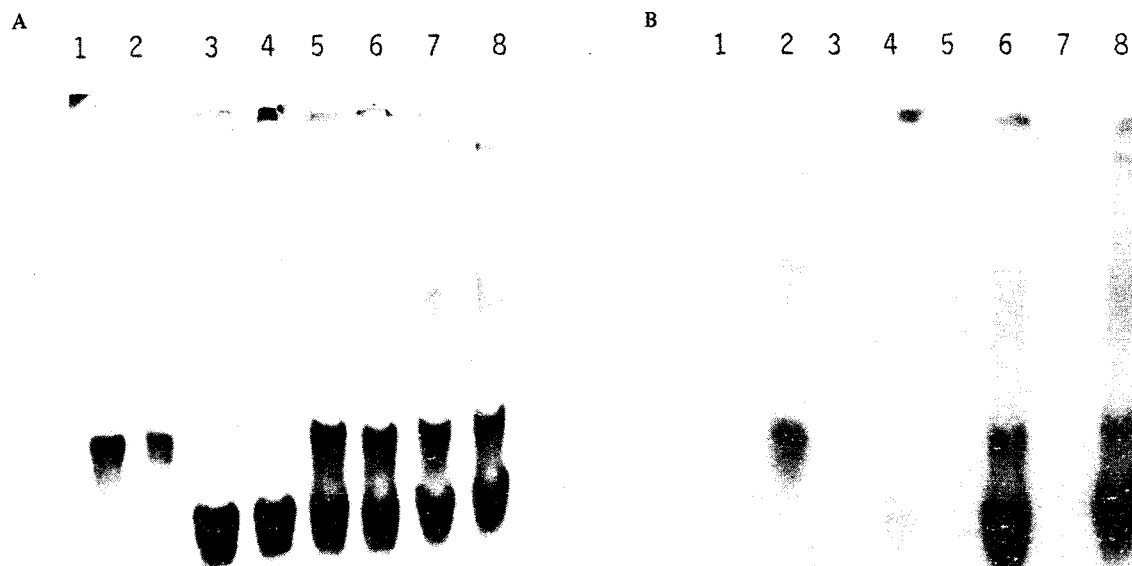


Fig.2. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of histones H3 and H4 and of complexes $(H3-H4)_2$ at pH 2.7, in 2.5 M urea: (1) native histone H3; (2) phosphorylated histone H3; (3) native histone H4; (4) phosphorylated histone H4; (5) native tetramer $(H3-H4)_2$; (6) phosphorylated tetramer $(H3-H4)_2$; (7) native acetylated tetramer $(H3-H4)_2$; (8) phosphorylated acetylated tetramer $(H3-H4)_2$; (A) staining with Coomassie brilliant blue; (B) autoradiography.

identical to those observed in the tryptic hydrolysate of phosphorylated histone H3. However, the tryptic hydrolysate of the tetramers is characterized by the presence of a highly labelled phosphopeptide which migrated rapidly on paper chromatography and was later on shown to originate from H4. No difference was observed between the autoradiograms of the tryptic peptides generated from non-acetylated and acetylated $(H3-H4)_2$ complexes.

Structural studies of the phosphorylated tryptic peptides isolated by chromatography on Chromobeads P (Technicon Corp.) allowed us to identify the sites of phosphorylation in histone H3 and in the tetramer $(H3-H4)_2$ (table 1). No phosphopeptide was found in the tryptic digest of individual histone H4.

In histone H3 alone or interacting with histone H4, one serine residue at position 10 was phosphorylated by the cAMP-dependent protein kinase. This site was located next to a residue of methylated lysine in the highly basic amino-terminal sequence of the molecule.

On the other hand, it is worth noticing that the

Table 1
Sites of in vitro phosphorylation of histones

Histones	Sequences of ^{32}P -labelled tryptic peptides
H3, individual or in the tetrameric complex	${}^a(\text{Arg}-\overset{\text{Me}}{\underset{ }{\text{Lys}}}-\overset{\text{P}}{\underset{ }{\text{Ser}}}_{10}-\text{Thr}-\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Lys})$
H4, in the tetrameric complex only	$(\text{Arg})-\text{Ile}-\overset{\text{P}}{\underset{ }{\text{Ser}}}_{47}-\text{Gly}-\text{Leu}-\text{Ile}-\text{Tyr}-\text{Glu}-\text{Glu}-\text{Thr}-\text{Arg})$

^a Residues in parentheses are not included in the tryptic peptides. They are written to show that the phosphorylation

sites are placed in a sequence $B-\overset{\text{P}}{\underset{|}{\text{X}}}-\text{Ser}$ where B is a basic amino acid and X any amino acid

serine residue at position 28 of histone H3 which is located in the same sequence as Ser₁₀: Ala-Arg-(Me)Lys-Ser was not found phosphorylated. Since Ser₂₈ is located outside the region of the molecule involved in protein-protein interactions, the sequence just after the serine residue must be essential for the specific recognition by the protein kinase.

In the tetramer (H3-H4)₂ acetylated or not, histone H4 was a better substrate than histone H3 and was phosphorylated at Ser₄₇.

Phosphorylated sites by a cAMP-dependent protein kinase occur generally on a serine residue located in a sequence B-X-Ser where B is lysine or arginine and X any amino acid (table 1): Ser₁₀ in histone H3 and Ser₄₇ in histone H4 interacting with histone H3 are placed in such a sequence.

Phosphorylated Ser₄₇ in histone H4 is located at the edge of the structured apolar region which interacts with histone H3 to form the complex [8]. This fact has already been observed in the dimer H2A-H2B where phosphorylation sites (Ser₁₉ in histone H2A and Ser₃₂, Ser₃₆ in histone H2B) are located in a similar manner at the edge of the interacting regions [12].

Individual histone H4 was not phosphorylated. This was not surprising because histone H4 self-associates in solution to form aggregates and circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectroscopic work [19,20] has clearly shown that the C-terminal part of the molecule (residues 38-102) is involved in the formation of secondary and tertiary structures. Therefore, in the aggregated state of H4, the Ser₄₇ was not accessible to the protein kinase.

On the other hand, we have observed that, although histones H4 and H2A have an identical amino-terminal sequence (residues 1-5) the amino-terminal residue (N-acetylserine) was not phosphorylated in histone H4 or in the tetramer (H3-H4)₂ as it was in individual histone H2A and in the dimer H2A-H2B [12].

The only possible explanation is that the structural conformation of the tetramer (H3-H4)₂ or of H4 in the aggregated form is such that the amino-terminal sequence of histone H4 is not accessible to the enzyme. However, this is in contradiction with the fact that basic N-terminal regions of histones are free and mobile in solution and thus available for interaction with DNA [9].

Acknowledgements

We are very much indebted to Dr J. Pichon (Insti-

tut de Chimie Biologique, Marseille) for the preparation of γ -[³²P]ATP. We acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of Mrs D. Belaïche, M. J. Dupire, T. Ernout and A. Hemez. We thank Dr M. H. Loucheux for giving us access to the CD spectrophotometer. This work was supported by grants ATP 4206 and LA 268 from the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- [1] Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J. and Allfrey, V. G. (1975) *Science* 190, 117-128.
- [2] Delange, R. J., Hooper, J. A. and Smith, E. L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3261-3274.
- [3] DeLange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L. and Bonner, J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5669-5679.
- [4] Marzluff, W. F. and McCarty, K. S. (1972) *Biochemistry* 11, 2677-2681.
- [5] Sung, M. T. and Dixon, G. H. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1616-1623.
- [6] Arfmann, H. A. and Bode, J. (1980) *Int. J. Biol. Macromol.* 2, 109-112.
- [7] Shoemaker, C. B. and Chalkley, R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11048-11055.
- [8] Bohm, L., Hayashi, H., Cary, P. D., Moss, T., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E. M. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 487-493.
- [9] Bradbury, E. M., Moss, T., Hayashi, H., Hjelm, R. P., Suau, P., Stephens, R. M., Baldwin, J. P. and Crane-Robinson, C. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 277-286.
- [10] Thomas, J. O. and Kornberg, R. D. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2626-2630.
- [11] Szopa, J., Jacob, G. and Arfmann, H. A. (1980) *Biochemistry* 19, 987-990.
- [12] Martinage, A., Mangeat, P., Laine, B., Couppez, M., Sautière, P., Marchis-Mouren, G. and Biserte, G. (1980) *FEBS Lett.* 118, 323-329.
- [13] Mangeat, P., Chahinian, H. and Marchis-Mouren, G. (1978) *Biochimie* 60, 777-785.
- [14] Whitlock, J. P., Augustine, R. and Schulman, H. (1980) *Nature* 287, 74-76.
- [15] Johns, E. W. (1967) *Biochem. J.* 105, 611-614.
- [16] Couppez, M., Sautière, P., Brahmachari, S. K., Brahms, J., Liquier, J. and Taillandier, E. (1980) *Biochemistry* 19, 3358-3363.
- [17] Glynn, I. M. and Chappel, J. B. (1964) *Biochem. J.* 90, 147-149.
- [18] Panyim, S. and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
- [19] Lewis, P. N., Bradbury, E. M. and Crane-Robinson, C. (1975) *Biochemistry* 14, 3391-3400.
- [20] Crane-Robinson, C., Hayashi, H., Cary, P. D., Briand, G., Sautière, P., Krieger, D., Vidali, G., Lewis, P. N. and Tom-Kun, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 535-548.

DISCUSSION

L'histone H3 seule ou associée à l'histone H4 dans le tétramère (H3-H4)₂ est phosphorylée en un site localisé sur le résidu de sérine en position 10, dans la région N-terminale basique d'interaction avec le DNA. Ce site est situé à côté d'un résidu de lysine méthylée (en position 9) et près de l'un des deux sites d'acétylation de l'histone H3 (lysines 14 et 23). Curieusement, la sérine, en position 28 qui se trouve dans une séquence analogue à celle de la sérine en position 10 n'est pas phosphorylée:



Si le code B - X - Ser semble être important pour l'action de la kinase, il n'est pas suffisant pour expliquer sa spécificité. La séquence qui suit les résidus de sérine en position 10 et 28 doit sans aucun doute contribuer à cette spécificité. Nous savons par ailleurs que la structure primaire, si importante soit-elle, ne suffit pas pour expliquer l'action de la kinase. Les sites de phosphorylation dans une protéine sont par définition accessibles à l'enzyme donc localisés dans des zones "exposées" en coude β ou à proximité de ces zones.

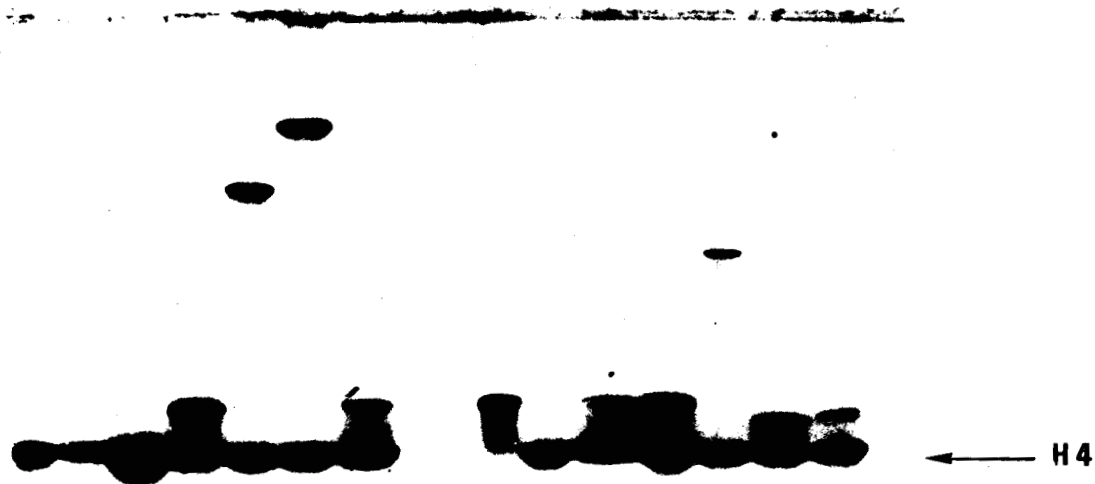
L'absence de phosphorylation de l'histone H4 libre s'explique par la formation d'agrégats lorsque cette histone est en solution, agrégats qui rendent les sites potentiels de phosphorylation inaccessibles à l'enzyme. Ainsi, l'addition de myoglobine, d'ovalbumine ou d'albumine à l'histone H4 en solution favorise la phosphorylation de cette histone en empêchant son agrégation (Figure 18). D'autre part, lorsque l'histone H4 interagit avec

FIGURE 18 ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS
(LAEMMLI et FAVRE, 1973)

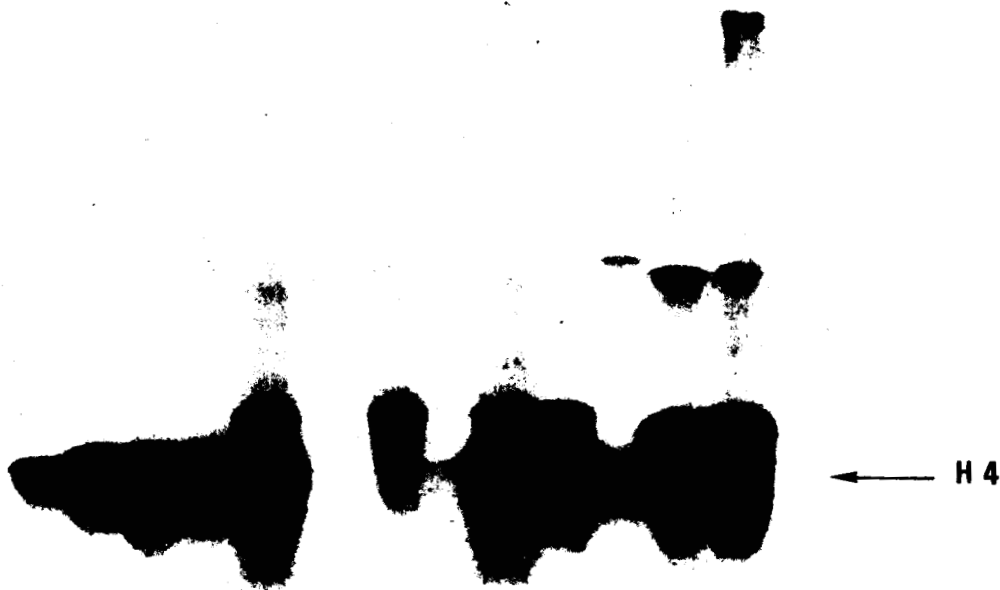
- 1 Histone H4 (1 μ g) + Cytochrome C (1 μ g) phosphorylés
- 2 Cytochrome C natif
- 3 Histone H4 (4 μ g) + Cytochrome C (4 μ g) phosphorylés
- 4 Histone H4 + Myoglobine phosphorylées
- 5 Histone H4 + Qvalbumine phosphorylées
- 6 Histone H4 + Sérumalbumine phosphorylées
- 7 Complexe H3-H4 phosphorylé

- 8 Histone H3 phosphorylée
- 9 Histone H4 phosphorylée
- 10 Complexe H3-H4 phosphorylé
- 11 Histones H3 + H4 phosphorylées
- 12 Histones H4 + H1 phosphorylées
- 13 Histones H4 + H2A phosphorylées
- 14 Histones H4 + H2B phosphorylées

Coloration au bleu de Coomassie



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Autoradiographie

l'histone H3 pour former le tétramère $(H3-H4)_2$, une quantité importante de phosphate $[^{32}P]$ est incorporée dans l'histone H4 au niveau du résidu de sérine en position 47. Comme nous l'avons déjà observé pour le dimère H2A-H2B, ce site est localisé au bord de la région apolaire qui interagit avec l'histone H3. Malgré l'identité des séquences amino-terminales (résidus 1 à 5) des histones H2A et H4, le résidu de N-acétylsérine n'est phosphorylé ni dans l'histone H4 seule en solution en raison de l'agrégation de la protéine, ni dans le tétramère. La seule explication possible semble être la conformation du tétramère dont nous connaissons le rôle structural fondamental dans le nucléosome.

La présence d'histones H3 et H4 acétylées au sein du complexe $(H3-H4)_2$ ne modifie en rien la phosphorylation du complexe dont la cinétique d'incorporation de phosphate $[^{32}P]$ est superposable à celle donnée par le tétramère non-acétylé et où l'histone H4 est, comme précédemment, un meilleur substrat pour la kinase que l'histone H3.

IV - 2 PHOSPHORYLATION DE L'HISTONE H5 PAR UNE KINASE INDEPENDANTE DE L'AMP CYCLIQUE : PUBLICATION 6

Les sites de phosphorylation de l'histone H5 ont été identifiés *in vitro* en présence d'une kinase AMP cyclique dépendante (KUROCHKIN et coll., 1977; MARTINAGE et coll., 1980, publication 4 page 184) et *in vivo* (SUNG et FREEDLENDER, 1978). Bien que différents ces sites sont *in vitro* comme *in vivo*, des résidus de sérine localisés dans les régions N- et C-terminales de la protéine ; aucune modification n'est décelée dans la région globulaire centrale. Dans l'histone H1, un seul résidu de sérine (sérine 37) est phosphorylé par la kinase AMP-cyclique dépendante. Par contre, les sites de phosphorylation de cette histone par une kinase non activée par l'AMP cyclique sont préférentiellement des résidus de thréonine localisés dans les régions N- et C-terminales (LANGAN, 1978) (Voir tableau 2, page 209). L'identification de ces sites repose sur une étude comparative des séquences adjacentes aux sites de phosphorylation. En effet, la présence de plusieurs sous-fractions de l'histone H1 (4 à 5) et la difficulté de les isoler a très fortement limité les études structurales de cette histone.

A ce jour, une seule structure complète d'histone H1 a été déterminée : il s'agit de la sous-fraction RTL-3 (rabbit thymus lysine, sous-fraction 3) dont la séquence a été établie par COLE (1977). Dans ces conditions, la localisation des sites de

phosphorylation dans les différentes sous-fractions de l'histone H1 est forcément limitée. Par contre, l'histone H5 dont la séquence a été déterminée dans notre laboratoire (BRIAND et coll., 1980) est constituée d'une seule chaîne protéique. Cette histone qui remplace progressivement l'histone H1 au cours de la maturation de l'érythrocyte présente une grande analogie structurale avec l'histone H1. Nous avons donc étudié la phosphorylation de l'histone H5 en présence d'une kinase non activée par l'AMP cyclique et recherché quelle était la spécificité de cette kinase dont le seul substrat parmi les histones était l'histone H1.

Ce travail ouvrait en 1980 une collaboration avec C. QUIRIN-STRICKER (Faculté de Médecine de l'Université Louis Pasteur à Strasbourg) qui avait isolé une kinase de plasmocytome de Souris, spécifique de l'histone H1 et non activée par les nucléotides cycliques (QUIRIN-STRICKER et SCHMITT, 1981).

PHOSPHORYLATED SITES OF CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H5 BY A CYCLIC AMP-INDEPENDENT PROTEIN KINASE FROM MOUSE PLASMOCYTOMA CELLS

A. MARTINAGE, C. QUIRIN-STRICKER[†], M. CHAMPAGNE* and P. SAUTIERE

Unité 124 de l'INSERM et Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59000 Lille, [†]Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes, Faculté de Médecine, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg and *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue Descartes, 67000 Strasbourg, France

Received 8 August 1981; revision received 15 September 1981

1. Introduction

During erythropoiesis, the chicken erythrocyte-specific histone H5 progressively but incompletely substitutes histone H1. In early stages, newly synthesized histone H5 is phosphorylated to a high extent. Later on, dephosphorylation of histone H5 occurs in mature erythrocyte [1].

Structural analogy between histones H1 and H5 suggests a similar role for both proteins and phosphorylation of histone H1 has been correlated with the rate of cell division in different tumors [2] and with the condensation of chromatin [3] but phosphorylation of histone H5 is related to cell maturation and its degree of phosphorylation is proportional to the number of immature cells in anemic chickens and, at the terminal stage of development in mature red blood cells histone H5 is completely dephosphorylated [4]. This dephosphorylation has been detected when the chromatin reaches a highly condensed state [5]. The progressive displacement of histone H1 by histone H5 during cell maturation can be compared with that of histones by protamines during spermiogenesis where protamines are synthesized, then extensively modified by phosphorylation and dephosphorylated when spermatozoa leave the testis.

Phosphorylation also modifies histone-DNA interactions and chromatin conformation: for example, phosphorylation can modulate histone H5-nucleosome interactions [6]. Sites of phosphorylation of histone H5 have been investigated in vivo [4], and in vitro using the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from pig brain [7] and from rat pancreas [8]. Even if the specificity is different from one kinase to another, the sites of phosphoryla-

tion in histone H5 are distributed in vitro as in vivo in two distinct regions of the protein: the amino-terminal region (residues 1-21) and the carboxy-terminal region (residues 101-189); in all cases, no site has been detected in the globular part of the molecule (residues 22-100) [9]. This fact has been already mentioned for histone H1 which, like histone H5, contains 3 different domains: a short apolar amino-terminal part in random coil (residues 1-34); a globular central part (residues 35-120); and a highly basic carboxy-terminal part in random coil (residues 121-213) [10]. Phosphorylation of histone H1 by a cyclic AMP-dependent protein kinase only takes place at serine residue 37 in the amino-terminal region of the molecule while phosphorylation by a cyclic AMP-independent protein kinase occurs at serine and threonine residues, mainly in the carboxy-terminal region.

This paper deals with the in vitro phosphorylation of chicken erythrocyte histone H5 by a cAMP-independent growth-associated protein kinase isolated from mouse plasmocytoma cells. This kinase has been shown to specifically phosphorylate histone H1; the core histones H2A, H2B, H3 and H4 are not phosphorylated.

Due to the close structural and functional relationship between histones H1 and H5, the kinase was assayed with histone H5. Five serine residues at positions 3, 7, 104, 117 and 148 were phosphorylated.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of histone H1-specific protein kinase from mouse plasmocytoma cells

A cAMP-independent protein kinase with high specificity for histone H1 (PKH1) was purified from mouse plasmocytoma by 30-50% ammonium sul-

fate precipitation followed by chromatography on DEAE-52 cellulose, hydroxylapatite, phosphocellulose and Sephadex G-200 columns as in [11]. It had a specific activity of 0.7–1 unit/mg histone H1.

2.2. Phosphorylation of histone H5

The phosphorylation of chicken erythrocyte histone H5 (25 mg) by purified histone H1 kinase (PKH1) (enzyme/histone ratio 1/1000) was performed for 12 h at 34°C in 12 ml reaction mixture containing: 30 mM Tris-HCl (pH 7.6); 10 mM Mg-acetate; 1 mM dithiothreitol; 0.2 mM EGTA and 0.3 mM ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$). The reaction mixture was then dialysed 15 h against deionised water and lyophilised.

2.3. Limited acid hydrolysis

For identification of phosphoserine and phosphothreonine ^{32}P -labelled histone H5 was hydrolysed for 2 h at 110°C under vacuum with 6 N HCl [12]. The hydrolysate was submitted to electrophoresis at 2500 V for 2 h on Whatman 3 MM paper at pH 1.9 (acetic acid/formic acid/water, 35:10:400, by vol.). Unlabelled phosphoserine and phosphothreonine were used as markers.

2.4. Localization of phosphorylation sites

Tryptic hydrolysis, fractionation of tryptic hydrolysate and identification of phosphorylated sites were performed as in [8].

Table 1
Sites of *in vitro* phosphorylation of histone H5 determined from ^{32}P -labelled tryptic peptides

	Amounts of phosphorylation ^a
A: By a cAMP-independent protein kinase from mouse plasmocytoma cells	
(H) Thr-Glu-Ser ₃ ^P -Leu-Val-Leu-Ser ₇ ^P -Pro-Ala-Pro-Ala-Lys-Pro-Lys	5
(Lys-Arg) ^b -Ser ₁₀₄ ^P -Pro-Gly-Lys-Lys	10
Ser-Thr-Ser ₁₁₇ ^P -Pro-Lys	43
Ser-Thr-Ser ₁₁₇ ^P -Pro-Lys-Lys	6
Ser-Arg-Ala-Ser ₁₄₈ ^P -Pro-Lys	36
B: By a cAMP-dependent protein kinase from rat pancreas [8]	
(Arg-Arg)-Ser ₂₂ ^P -Ala-Ser-His-Pro-Thr-Tyr-Ser ₂₉ ^P -Glu-Met-Ile-Ala-Ala-Ala-Ile-Arg	20
Lys-Lys-Ser ₁₄₅ ^P -Arg	50
Lys-Ala-Ser ₁₆₆ ^P -Lys-Ala-Lys-Lys	30

^a The amounts of phosphorylation are expressed in % of the total amount of [^{32}P]phosphate incorporated into the protein

^b Residues in parentheses are not included in the tryptic peptides. They are written to show that most of the phosphorylation

sites are located in a sequence B-X-Ser^P where B is a basic amino acid and X any amino acid

3. Results and discussion

Phosphoserine only was shown to be present in the 2 h-hydrolysate of histone H5 phosphorylated by the cAMP-independent protein kinase isolated from mouse plasmocytoma cells. By comparison calf thymus histone H1 was preferentially phosphorylated with this kinase on threonine residues (P-Ser/P-Thr ratio, 0.48).

Radioautography of the peptide map of the tryptic hydrolysate of the histone H5 labelled with [³²P]-phosphate shows 5 labelled peptides. Structural studies of the phosphorylated tryptic peptides isolated by ion-exchange chromatography on Chromobeads P (Technicon Corp.) allowed us to locate the phosphoserine residues in the sequence of the protein [13].

The sites of phosphorylation of histone H5 by the H1-specific cAMP-independent protein kinase from mouse plasmocytoma cells are presented in table 1. The phosphorylation sites of histone H5 phosphorylated with the cAMP-dependent protein kinase from rat pancreas [8] are given by comparison.

Five serine residues in histone H5 were phosphorylated to different extents by the H1-specific kinase. Two minor sites (serine-3, serine-7) were identified in the short hydrophobic sequence (residues 1–11) of the amino-terminal region of histone H5. The 3 other phosphorylation sites were found in the highly basic carboxy-terminal half of the protein, at serine residues 104, 117 and 148. Serine 117 is indeed the major site of phosphorylation of histone H5 for the H1-specific kinase since ~50% of the total ³²P-labelling was incorporated in that residue. The incomplete cleavage by trypsin of the Lys₁₁₉–Lys₁₂₀ bond generated two peptides and accounted for the presence of two radioactive spots corresponding to [³²P]Ser₁₁₇ on the peptide map of histone H5.

As shown in table 1, the phosphorylation sites of histone H5 by the H1-specific cAMP-independent kinase from mouse plasmocytoma cell are different from those phosphorylated by the cAMP-dependent kinase from rat pancreas.

However both enzymes phosphorylate essentially serine residues located in the highly basic domain of the protein which is thought to interact strongly in the chromatin with the phosphate groups of DNA but, whereas serine residues phosphorylated by the cAMP-independent kinase are adjacent to a proline residue, those phosphorylated by the cAMP-dependent kinase are located just before a basic residue.

The specificity of these two enzymes contrasts

sharply with that of cAMP-dependent protein kinase from pig brain which preferentially phosphorylates serine residues located in the globular domain (residues 22–100) of histone H5 [7,9].

Four of the 5 serine residues phosphorylated in vitro in H5 by the H1-specific cAMP-independent kinase are identical to those found phosphorylated in vivo [5]. The extent of labelling is however different. Nearly 50% of the ³²P-label are incorporated in vivo in the amino-terminal region of histone H5 (residues 1–21), equally distributed between serines at positions 3, 7. The remaining 50% are located in the carboxy-terminal half of the molecule at Ser₁₀₄ and Ser₁₄₈. Ser₁₁₇, major site of the in vitro phosphorylation by the cAMP-independent kinase does not appear to be phosphorylated in vivo.

As observed in histone H5 phosphorylated with a cAMP-dependent kinase from rat pancreas [8], the serine residues phosphorylated with the H1-specific cAMP-independent kinase are all located within regions in predicted β-turn conformation except Ser₃ [14,15]. In fact, the specificity of a given protein kinase is basically related to the recognition of specific amino acid sequences. Thus, the cAMP-independent kinase from mouse plasmocytoma cell phosphorylates with a marked specificity the serine residues in histone H5 just before a proline residue.

Obviously this specificity is similar to that of the growth-associated histone kinase which is bound to chromatin and catalyzes cAMP-independent phosphorylation of a number of serine and threonine residues in histone H1 [16]. The four sites of growth-associated phosphorylation which are located at positions 16, 136, 153 and 180 of the H1 subfraction RTL-3 [17] are all included in a repeat structure where a proline residue occurs next to a serine or threonine residue such as in Ser₁₆–Pro–Ala–Lys, Thr–Pro–Lys–Lys (positions 136 and 153) and Ser₁₈₀–Pro–Lys–Lys.

The recognition of such sequences by the cAMP-independent kinase from mouse plasmocytoma cells explains the narrow specificity of this kinase for the phosphorylation of histone H1 and of histone H5 which is closely related to histone H1 [13]. These sequences are only encountered in histones H1 and H5 but not in core histones H2A, H2B, H3 and H4.

Acknowledgements

The skillful technical assistance of Mrs D. Belaïche, M. J. Dupire, T. Ernout and A. Hémez is gratefully

acknowledged. This work was supported by grants ATP 4206 and LA 268 from the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- [1] Sung, M. T., Harford, J., Bundman, M. and Vidalakas, G. (1977) *Biochemistry* 16, 279-285.
- [2] Balhorn, R., Balhorn, M., Morris, H. P. and Chalkley, R. (1972) *Cancer Res.* 32, 1775-1784.
- [3] Chahal, S. S., Matthews, H. R. and Bradbury, E. M. (1980) *Nature* 287, 76-79.
- [4] Sung, M. T. (1977) *Biochemistry* 16, 286-290.
- [5] Sung, M. T. and Freedlender, E. F. (1978) *Biochemistry* 17, 1884-1890.
- [6] Hofmann, K. W., Arfmann, H. A., Bode, J. and Arellano, A. (1980) *Int. J. Biol. Macromol.* 2, 25-32.
- [7] Kurochkin, S. N., Andreeva, N. B., Gasaryan, K. G., Severin, E. S. and Kurchatov, I. V. (1977) *FEBS Lett.* 76, 112-114.
- [8] Martinage, A., Mangeat, P., Laine, B., Couppez, M., Sautière, P., Marchis-Mouren, G. and Biserte, G. (1980) *FEBS Lett.* 118, 323-329.
- [9] Aviles, F. J., Chapman, G. E., Kneale, G. G., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E. M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 88, 363-371.
- [10] Hartman, P. G., Chapman, G. E., Moss, T. and Bradbury, E. M. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 45-51.
- [11] Quirin-Stricker, C. and Schmitt, M. (1981) *Eur. J. Biochem.* in press.
- [12] Cohen, P., Rylatt, D. B. and Nimmo, G. A. (1977) *FEBS Lett.* 76, 182-186.
- [13] Briand, G., Kmiecik, D., Sautière, P., Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. and Champagne, M. (1980) *FEBS Lett.* 112, 147-151.
- [14] Briand, G. (1981) *Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles*, Lille.
- [15] Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974) *Biochemistry* 13, 211-221.
- [16] Langan, T. A. (1978) in: *Methods in Cell Biology* (Stein, G., Stein, J. and Kleinsmith, L. J. eds) vol. 19, pp. 127-142, Academic Press, London, New York.
- [17] Cole, R. D. (1977) in: *The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus* (Ts'o, P. ed) pp. 93-104, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, New York.

DISCUSSION

L'histone H5 phosphorylée en présence d'une kinase indépendante de l'AMP cyclique isolée de plasmocytome de Souris ne contient pas de phosphothréonine, contrairement à ce que nous avons observé dans l'histone H1 où les résidus de thréonine sont préférentiellement phosphorylés par rapport aux résidus de sérine (P-Ser/P-Thr = 0.48). Les sites de phosphorylation que nous avons déterminés sont localisés essentiellement dans la région C-terminale, région d'interaction avec le DNA. Deux sites mineurs sont situés à l'extrémité N-terminale de la protéine (sérines 3 et 7).

Quatre résidus de sérine phosphorylée sur les cinq identifiés *in vitro* sont identiques à ceux trouvés *in vivo*. L'intensité du marquage par le phosphate [^{32}P] est cependant différente: en effet les sites mineurs *in vitro* (sérines 3 et 7) retiennent environ 50 p.100 de la radioactivité *in vivo*.

La kinase "spécifique de l'histone H1" accepte donc un autre substrat: l'histone H5. Ceci n'est pas étonnant lorsque l'on connaît l'analogie structurale des deux protéines. Si la kinase activée par l'AMP cyclique phosphoryle des résidus de sérine localisés dans une séquence de type acide aminé Basique - X - Ser, la kinase non activée par l'AMP cyclique et associée à la croissance a une spécificité différente et nécessite la présence de proline et de lysine du côté C-terminal de la sérine ou de la thréonine phosphorylée suivant le code $\begin{matrix} \text{Ser} \\ \text{Thr} \end{matrix}$ - Pro - X - Lys: tableau II. L'absence de phosphothréonine dans l'histone H5 est liée au fait qu'aucun résidu de thréonine ne se trouve dans une telle séquence.

Dans les deux cas, les sites de phosphorylation sont localisés dans des régions exposées de conformation en coude β . De plus, la spécificité de la kinase indépendante de l'AMP cyclique est analogue à celle de la kinase endogène qui phosphoryle *in vivo* l'histone H5 et qui se trouve étroitement liée à la chromatine.

TABLEAU II

ENVIRONNEMENT DES SITES DE PHOSPHORYLATION DANS LES HISTONESH5 ET H1Histone H5 (érythrocyte de Poulet)

P
|
Arg - Ser - Pro - Gly - Lys
104

P
|
Thr - Ser - Pro - Lys - Lys
117

P
|
Ala - Ser - Pro - Lys - Lys
148

Histone H1 (foie de Rat) (LANGAN, 1978)

P
|
Lys - Thr - Pro - Val - Lys
16

P
|
Ala - Thr - Pro - Lys - Lys
136

P
|
Lys - Thr - Pro - Lys - Lys
153

P
|
Lys - Ser - Pro - Lys - Lys
180

CHAPITRE V

PHOSPHORYLATION DE LA "CORE PARTICLE" ET DE LA CHROMATINE

PLAN DU CHAPITRE V

PHOSPHORYLATION DE LA "CORE PARTICLE" ET DE LA CHROMATINE

- V - 1 PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE
- V - 2 PHOSPHORYLATION EN PRESENCE D'UNE KINASE ACTIVEE PAR
L'AMP CYCLIQUE
- V - 3 IDENTIFICATION DES HISTONES PHOSPHORYLEES
- V - 4 INFLUENCE DE LA PHOSPHORYLATION SUR LA STRUCTURE DE LA
CHROMATINE : CONTROLES IMMUNOCHIMIQUES ET OBSERVATIONS
EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Ce travail a été réalisé en collaboration étroite avec les Docteurs M.CHAMPAGNE et A.MAZEN (IBMC, Strasbourg) et avec la participation du Professeur G.MARCHIS-MOUREN (Université d'Aix-Marseille), du Docteur S.MULLER (IBMC, Strasbourg) et du Docteur C.QUIRIN-STRICKER (ULP, Strasbourg).

V - 1 PREPARATION DU MATERIEL D'ETUDE

Pour ce travail nous avons choisi l'érythrocyte de Poulet, cellule qui renferme, outre les cinq types d'histones habituels, une histone spécifique, l'histone H5 qui remplace en grande partie l'histone H1 ($H1/H5 \approx 0.33$).

Notre étude a porté simultanément sur :

- la phosphorylation de la "core particle", sous-unité de base de la chromatine
- la phosphorylation de la chromatine après dissociation des histones H1, H5 et des protéines non-histones
- la phosphorylation de la chromatine native.

Notre but étant d'étudier l'influence de la phosphorylation sur la structure de la chromatine, les méthodes de préparation choisies sont des méthodes "douces" qui revêtent une importance fondamentale pour l'interprétation et la validité des résultats obtenus.

Les différentes étapes de préparation représentées dans la figure 19 sont effectuées à 4°C.

Isolement des noyaux - Les noyaux sont préparés à partir d'érythrocytes matures de Poulet selon la méthode de HEWISH et BURGOYNE (1973) modifiée par WILHELM et coll.(1978).

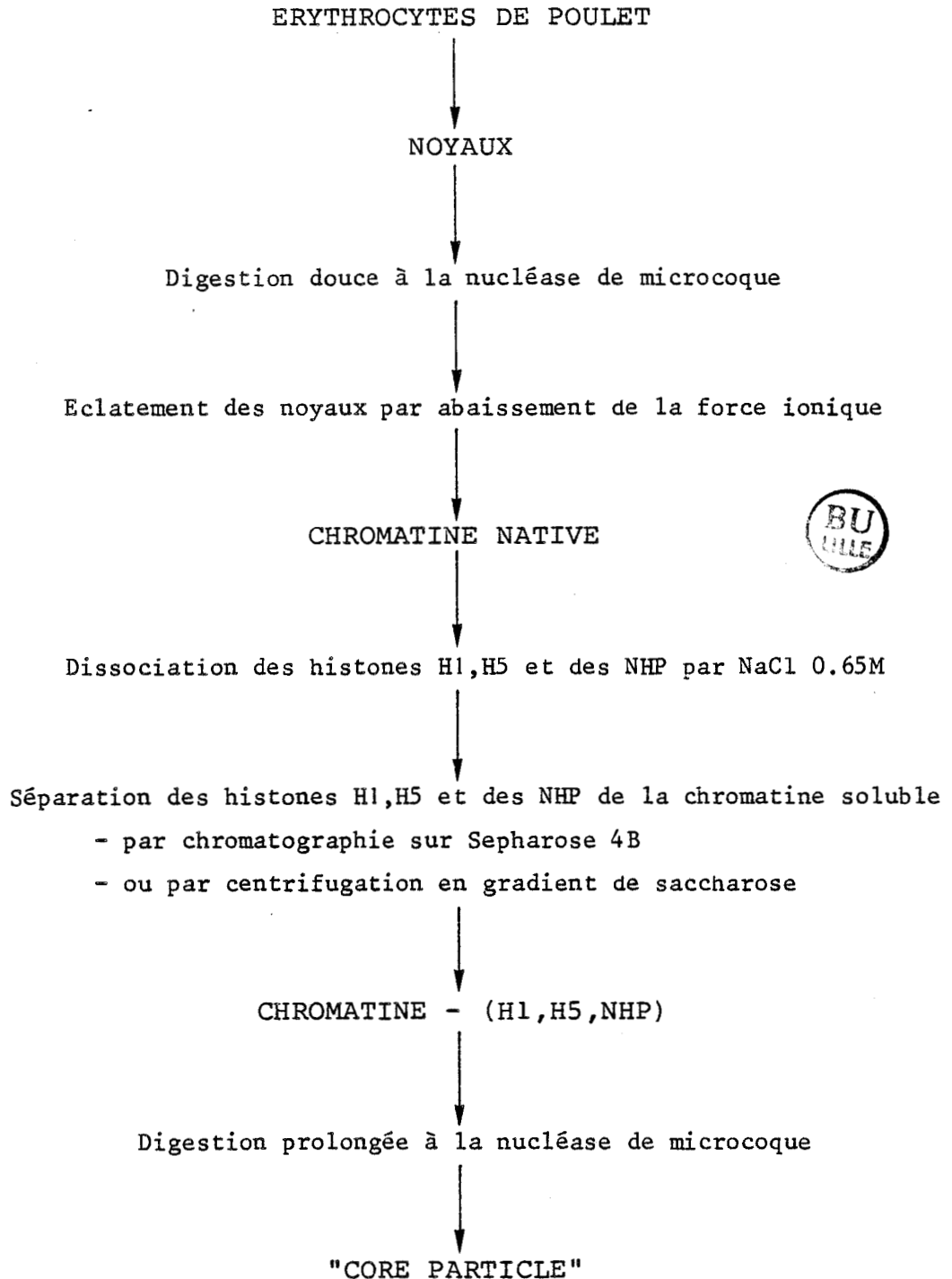


FIGURE 19 ETAPES DE PREPARATION DU MATERIEL UTILISE
POUR LA PHOSPHORYLATION

Préparation de la chromatine native - En vue d'obtenir de longs fragments de chromatine (NOLL et coll., 1975) les noyaux isolés sont incubés pendant un temps très court (de l'ordre de 1 minute) à 37°C, avec la nucléase de microcoque puis sont lysés par abaissement de la force ionique dans une solution d'EDTA 0.2 mM, pH 8.0. Le surnageant obtenu après centrifugation est la chromatine "native" dont une aliquote sera soumise à la phosphorylation.

Isolement de la chromatine après dissociation des histones H1, H5 et des protéines non-histones - Les histones H1, H5 et les protéines non-histones (NHP) sont dissociées de la chromatine par addition de NaCl jusqu'à une concentration finale de 0.65M. La chromatine débarrassée des histones H1, H5 et des NHP est isolée :

- soit par chromatographie sur Sepharose 4B en tampon Tris 5 mM, pH 7.5 - NaCl 0.65M - 2-mercaptoéthanol 0.2 mM. - PMSF 1 mM.

- soit par centrifugation en gradient de 5 à 28 p.100 de saccharose en milieu NaCl 0.65M tamponné comme ci-dessus.

La chromatine ainsi obtenue après dissociation des histones H1, H5 et des NHP sera utilisée en partie pour la préparation des "core particles", l'autre partie étant réservée pour les expériences de phosphorylation.

Préparation de la "core particle" - La chromatine débarrassée des histones H1, H5 et des NHP est soumise à une digestion poussée par la nucléase de microcoque jusqu'à ce que 30 p.100 du matériel soit acido-soluble : les "core particles" sont alors isolées par centrifugation (méthode de LUTTER, 1978, modifiée par DE MURCIA et coll., 1980).

V - 2 PHOSPHORYLATION EN PRESENCE D'UNE KINASE ACTIVEE PAR
L'AMP CYCLIQUE

Le milieu d'incubation utilisé pour phosphoryler les histones isolées ou les complexes d'histones, en présence de la kinase de pancréas de Rat contient du chlorure de magnésium 12 mM, quantité nécessaire pour une activité maximale de l'enzyme. Cependant, pour phosphoryler la chromatine, il n'est pas possible d'utiliser une telle concentration en $MgCl_2$ qui entraîne une précipitation importante de matériel.

Dans une première étape, nous avons utilisé les conditions de ARFMANN et BODE (1980) qui n'observaient aucune précipitation lorsqu'ils phosphorylaient la "core particle" ou la chromatine après dissociation des histones H1, H5 et des NHP. Le milieu d'incubation est le suivant :

Tris	50 mM	pH 7.4
$MgCl_2$	10 mM	
Dithiothréitol	1 mM	
EDTA	0.3 mM	
$[\gamma-^{32}P]ATP$	0.3 mM	

Les échantillons sont mélangés au milieu d'incubation de façon à obtenir une concentration finale en protéines de 0.5 mg/ml. Le mélange est incubé pendant 20 heures à 35°C avec la kinase activée par l'AMP cyclique.

Dans nos mains, la phosphorylation de la chromatine après dissociation des histones H1, H5 et des NHP, en présence

de MgCl_2 10 mM provoquait une précipitation immédiate et importante. Des essais réalisés parallèlement avec une concentration en MgCl_2 5 mM nous donnèrent de meilleurs résultats. Toutefois, nous étions loin de la concentration en MgCl_2 requise pour une activité maximale de notre enzyme. Il faut signaler par ailleurs que cette méthode ne permet pas de phosphoryler la chromatine native contenant les histones H1 et H5 ainsi que l'ont observé ARFMANN et BODE (1980).

Dans une deuxième étape, nous avons alors choisi les conditions de phosphorylation ainsi que l'enzyme utilisé par TAYLOR (1982) ; il s'agit de la sous-unité catalytique de la protéine kinase de muscle cardiaque de Porc, kinase activée par l'AMP cyclique. Le milieu d'incubation est le suivant :

Tris	20 mM	pH 7.0
MgCl_2	2 mM	
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	0.8 mM	

La phosphorylation est réalisée pendant 1 heure à 35°C en présence de la kinase de muscle cardiaque de Porc ajoutée à la concentration de 20 unités enzymatiques/ml.

Les avantages de cette méthode sont :

- la faible concentration en MgCl_2 qui évite toute agrégation de la chromatine et qui permet une activité enzymatique correcte
- la simplicité du milieu réactionnel
- la rapidité de la réaction.

En effet, la cinétique de la réaction de phosphorylation réalisée sur la chromatine et sur la chromatine après dissociation des histones H1, H5 et des NHP montre que l'incorporation

de phosphate [^{32}P] est très importante après 1 heure de phosphorylation (Figure 20). Il faut toutefois remarquer que dans le milieu d'incubation proposé par TAYLOR (1982), la chromatine débarrassée des histones H1, H5 et des NHP n'est que très faiblement phosphorylée ; ainsi, en prenant comme unité l'incorporation de phosphate [^{32}P] dans la "core particle", l'incorporation est de 0.33 dans la chromatine après dissociation des histones H1, H5 et des NHP et de 1.4 dans la chromatine. Par contre, dans le milieu réactionnel de ARFMANN et BODE (1980), la phosphorylation de la chromatine débarrassée des histones H1, H5 et des NHP est importante.

Pour identifier les histones phosphorylées et étudier l'impact de la phosphorylation sur la structure de la chromatine, nous devons nous placer dans les conditions opératoires les plus favorables c'est-à-dire éviter une agrégation de la chromatine et obtenir une incorporation maximale de phosphate [^{32}P]. C'est pourquoi nous avons été amenée à utiliser simultanément les milieux d'incubation proposés par ARFMANN et BODE (1980) et par TAYLOR (1982). Dans tous les cas, la réaction de phosphorylation est arrêtée par addition d'EDTA et par abaissement de la température à 0°C.

Pour mesurer l'incorporation de phosphate [^{32}P] dans chaque échantillon, une aliquote est prélevée, déposée sur un morceau de papier Whatman 3 MM (1x1cm) puis fixée et lavée plusieurs fois par une solution d'acide trichloracétique à 10 p.100. Après un lavage final dans un mélange éthanol-éther (v/v), l'incorporation est mesurée par effet Cerenkov.

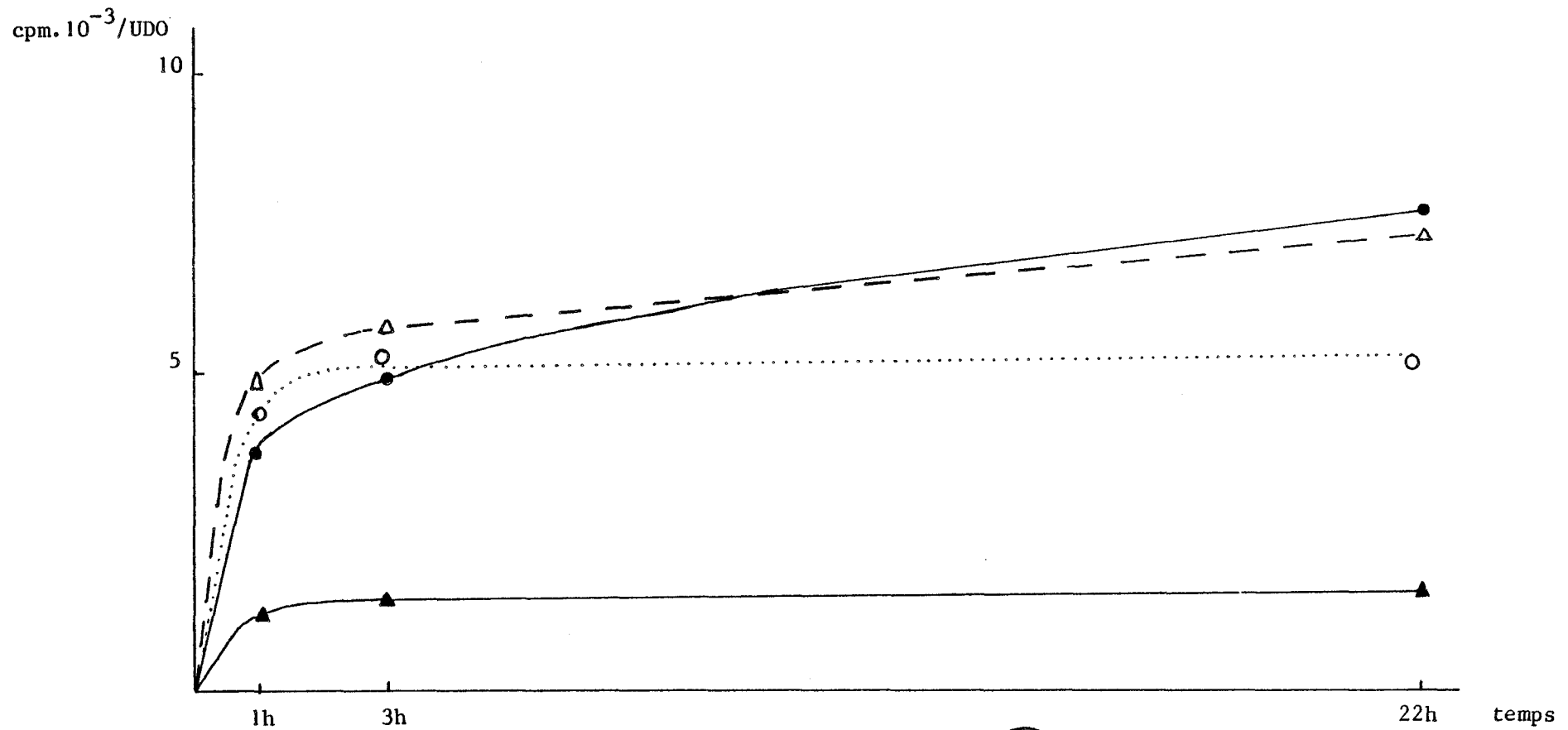


FIGURE 20 Cinétique d'incorporation du phosphate $[^{32}\text{P}]$ dans la chromatine incubée en milieu TAYLOR (●), en milieu ARFMANN et BODE (○) et dans la chromatine débarrassée des histones H1, H5 et des protéines non-histones incubée en milieu TAYLOR (▲), en milieu ARFMANN et BODE (Δ).

BU
FILE

V - 3 IDENTIFICATION DES HISTONES PHOSPHORYLEES

Après phosphorylation de la "core particle", de la chromatine débarrassée des histones H1, H5 et des NHP, et de la chromatine native, les histones modifiées sont identifiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide suivie soit d'une autoradiographie, soit du comptage de la radioactivité incorporée après découpage du gel.

La chromatine est d'abord dissociée par chauffage pendant 5 minutes à 100°C dans une solution de tampon Tris à 2.5 p.100, pH 6.8, contenant 2.5 p.100 de SDS, 5 p.100 de 2-mercaptoéthanol et 10 p.100 de glycérol (GOLDKNOPF et coll., 1980) puis l'électrophorèse est réalisée en gel SDS selon la technique de WEINTRAUB et coll. (1975). Le gel de polyacrylamide est ensuite coloré au Bleu de Coomassie R250 à 0.5 p.100 dans le mélange éthanol/acide acétique/eau (2/1/7 ; v/v). Après décoloration, le gel est soumis à une autoradiographie (Figure 21).

Dans la "core particle" d'érythrocyte de Poulet, seule l'histone H3 est accessible à la kinase de muscle cardiaque de Porc (Figure 21). La chromatine phosphorylée après dissociation des histones H1, H5 et des NHP incorpore également du phosphate [^{32}P] dans l'histone H3 mais l'incorporation y est trois fois plus faible que dans la "core particle". Dans les deux cas, la présence du DNA masque les sites potentiels de phosphorylation précédemment mis en évidence dans les histones H2A, H2B et H4.

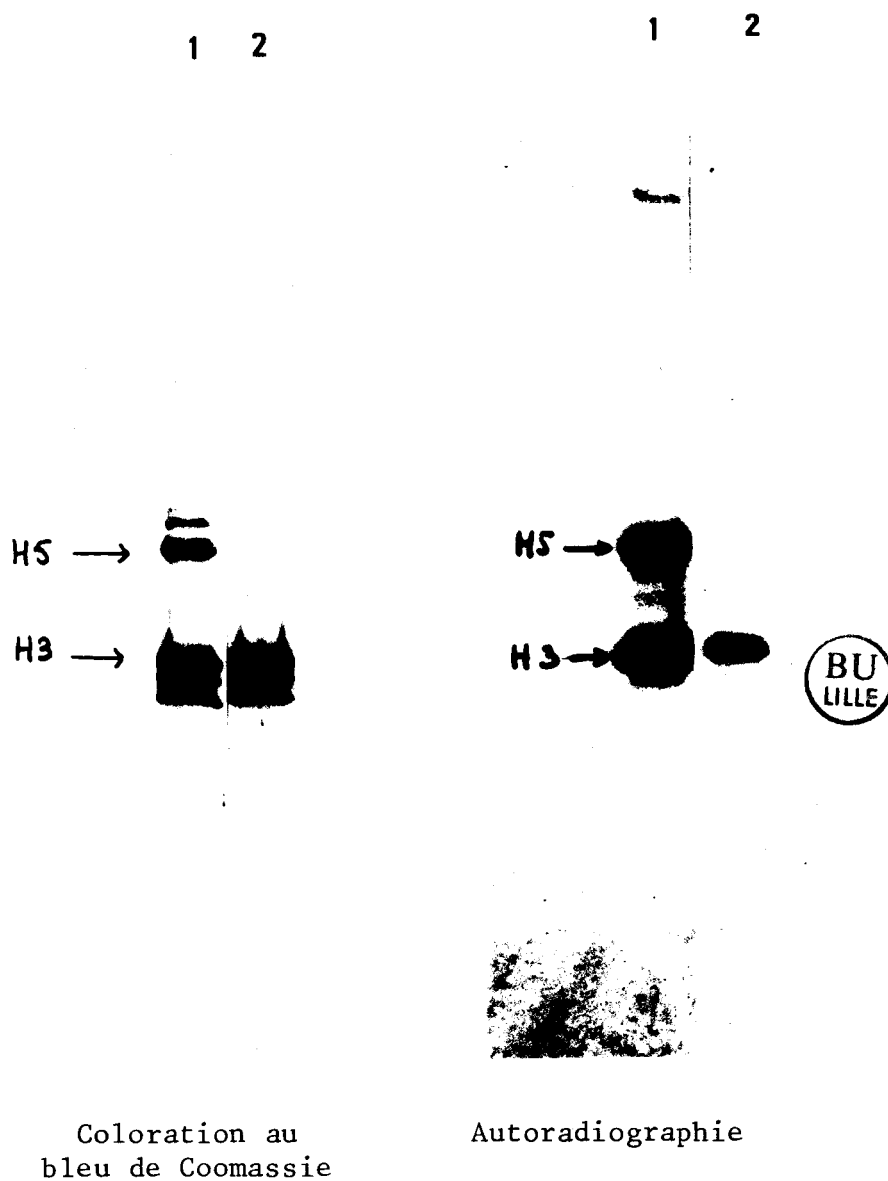


FIGURE 21 ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS (WEINTRAUB et coll., 1975) APRES DISSOCIATION DE LA CHROMATINE PENDANT 5 MINUTES A 100°C (GOLDKNOPF et coll., 1980)

1 Chromatine native

2 "Core particle"

Lorsque la chromatine native d'érythrocyte de Poulet est soumise à l'action de la kinase de muscle cardiaque de Porc, l'histone H3 est massivement phosphorylée ainsi que l'histone H5, l'histone H1 par contre, ne l'est pas (ou très peu) (Figure 21). Ceci paraît au premier abord surprenant ; c'est pourquoi, dans un essai réalisé dans les mêmes conditions, nous avons phosphorylé l'histone H1 seule, l'histone H5 seule, et le mélange des histones H1 et H5 en respectant les proportions relatives de chaque histone dans la chromatine ($H1/H5 \approx 0.33$). Nous avons observé, comme dans le cas de la chromatine, une phosphorylation importante de l'histone H5 tandis que l'incorporation de phosphate [^{32}P] au niveau de l'histone H1 était très faible. Ceci a pu être vérifié par mesure de la radioactivité associée à chaque histone après découpage du gel de polyacrylamide. La non-phosphorylation de l'histone H1 n'est donc pas liée à une inaccessibilité des sites à la kinase mais plutôt au fait que l'histone H1 est un mauvais substrat pour la kinase de muscle cardiaque de Porc, kinase activée par l'AMP cyclique.

Lors de récents essais, nous avons testé l'activité d'une kinase associée à la croissance et indépendante de l'AMP cyclique sur la chromatine et sur le mélange des histones H1 et H5. Cette kinase isolée de plasmocytome de Souris (QUIRIN-STRICKER et SCHMITT, 1981) "spécifique de l'histone H1" phosphoryle aussi l'histone H5 (Publication 6).

La phosphorylation de la chromatine a été réalisée en présence de la kinase non activée par l'AMP cyclique seule ou

associée à la kinase activée par l'AMP cyclique. Un essai a été réalisé sur le mélange des histones H1 et H5, en présence de la kinase non activée par l'AMP cyclique.

Dans le mélange des histones H1 et H5, les deux histones sont phosphorylées mais l'histone H1 n'incorpore que 20 p.100 de la radioactivité totale.

Dans la chromatine, la kinase non activée par l'AMP cyclique phosphoryle de façon similaire les histones H1 et H5 mais l'incorporation est 10 fois plus faible que dans les histones isolées. Cette diminution importante de la phosphorylation est en accord avec les observations de ARFMANN et BODE (1980) qui comparaient la phosphorylation des histones individuelles à celle des histones dans la "core particle". Toutefois, l'action conjuguée des deux kinases AMP cyclique-dépendante et -indépendante semble intensifier la phosphorylation des histones H3 et H5. L'histone H5 est, nous l'avons vu, un substrat pour les deux kinases, ceci explique l'augmentation de sa phosphorylation qui nécessiterait la localisation des sites modifiés. Il n'en va pas de même pour l'histone H3 dont l'augmentation de la phosphorylation observée en présence des deux kinases pourrait résulter de réactions de phosphorylation en chaîne comme il en existe beaucoup au cours des différents métabolismes cellulaires.

Ces résultats partiels et préliminaires tendent à renforcer l'importance de la phosphorylation de l'histone H3 et la relation possible entre la phosphorylation des histones H1-H5 et H3.

V - 4 INFLUENCE DE LA PHOSPHORYLATION SUR LA STRUCTURE DE LA
CHROMATINE : CONTROLES IMMUNOCHIMIQUES ET OBSERVATIONS
EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'influence de la phosphorylation des histones dans la chromatine d'érythrocyte de Poulet a été étudiée par immunochimie et par microscopie électronique.

Les contrôles immunochimiques réalisés par la méthode ELISA indiquent que la phosphorylation de l'histone H3 au sein de la "core particle" n'entraîne aucune modification dans l'accessibilité des déterminants antigéniques aux anticorps anti-histones.

Par contre, la phosphorylation de la chromatine d'érythrocyte de Poulet au niveau des histones H3 et H5 entraîne une diminution importante de la liaison des anticorps anti-H2B et anti-H5 ; en particulier, un anticorps monoclonal qui reconnaît la région N-terminale de l'histone H2B (résidus 20 à 40) ne reconnaît plus son site antigénique lorsque la chromatine est phosphorylée.

La modification de structure de la chromatine après phosphorylation mise en évidence par méthode immunochimique est confirmée par les observations en microscopie électronique (Figure 22). A force ionique faible (NaCl 20 mM), la chromatine a une structure caractéristique en zig-zag (Figure 22-A) tandis



FIGURE 22 ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE LA CHROMATINE

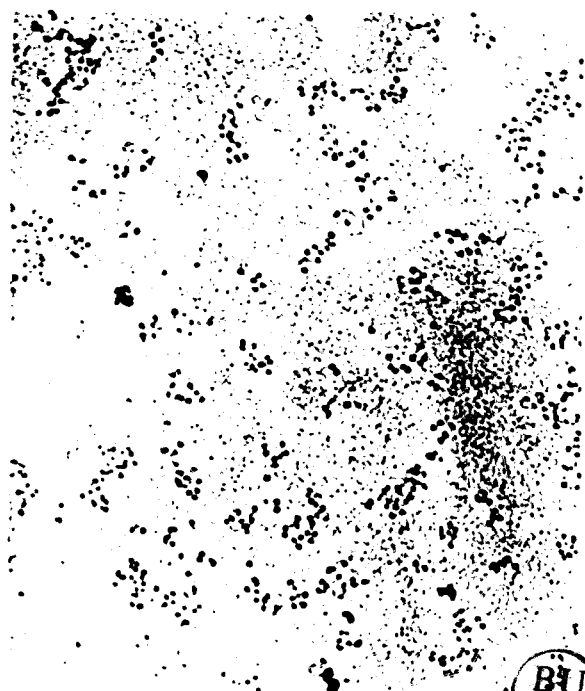
A faible force ionique (20 mM), chromatine native (A)
et chromatine après dissociation des histones H1, H5
et des protéines non-histones (B).

A force ionique élevée (80 mM), chromatine native (C)
et chromatine phosphorylée (D).

20 mM



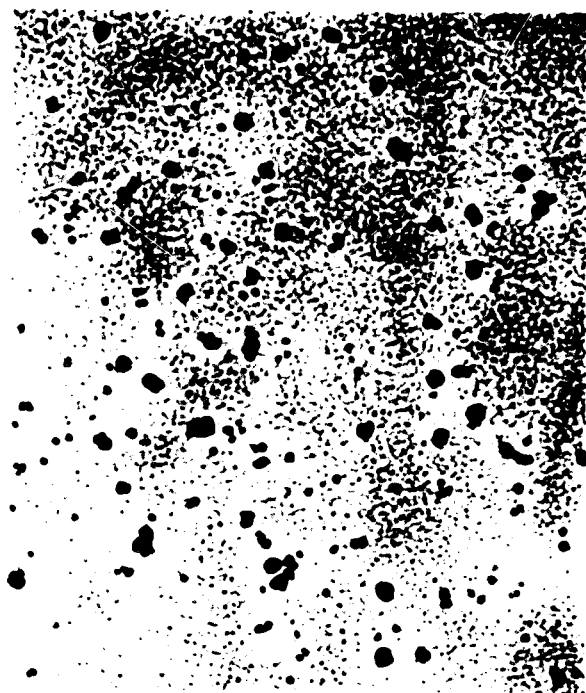
A



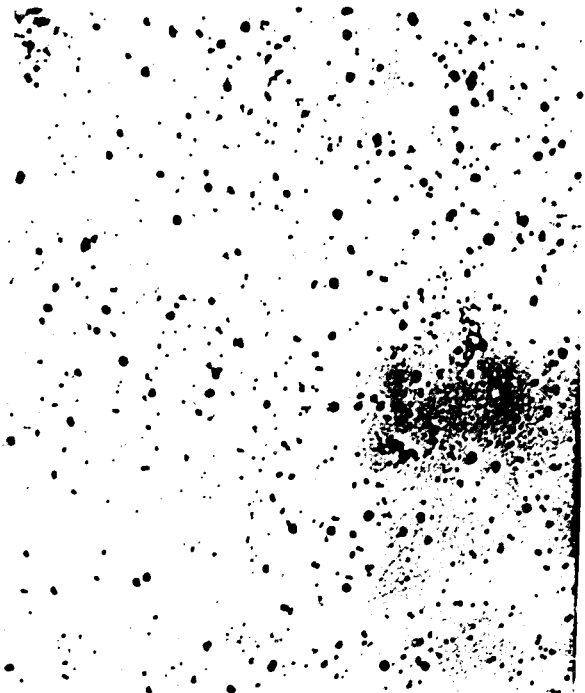
B



80 mM



C



D

qu'après dissociation des histones H1, H5 et des NHP, la conformation est plus relâchée et donne l'aspect du "collier de perles" (Figure 22-B).

A force ionique élevée (NaCl 80 mM), la chromatine présente une structure compacte en solénoïde (THOMA et coll., 1979) (Figure 22-C).

Par ailleurs, la chromatine phosphorylée en présence de kinase de pancréas de Rat, activée par l'AMP cyclique, apparaît beaucoup moins compacte (Figure 22-D) : la phosphorylation des histones H3 et H5 (ou de l'une d'entre elles) serait donc responsable de la diminution de condensation de la chromatine. Ces résultats sont partiels et préliminaires. Ils sont à rapprocher des observations de SUNG (1977) qui montrent que la phosphorylation de l'histone H5 est associée à une structure relâchée de la chromatine. Toutefois, ils s'opposent à la théorie généralement admise reliant phosphorylation et condensation de la chromatine.

CONCLUSION

Les histones H3 et H4 dont la stabilité structurale est maintenant bien établie, jouent un rôle essentiel dans l'organisation de la structure du nucléosome. Les autres "core" histones, H2A et H2B, dont les séquences présentent une assez grande variabilité, stabiliseraient la structure nucléosomale.

Chez l'Etoile de mer *Asterias rubens*, organisme primitif dans l'échelle de l'évolution, l'histone H2A est caractérisée par rapport à son homologue de thymus de Veau par :

- Cinq délétions localisées dans les régions basiques N- et C-terminales .
- Douze substitutions dont six ne sont pas conservatives. Parmi les douze substitutions, huit sont localisées dans la région centrale qui interagit avec l'histone H2B. Le remplacement d'un résidu hydrophobe par un résidu polaire neutre ou par un résidu aromatique peut être associé à un déplacement des zones d'interaction avec l'histone H2B comme cela a été mis en évidence par hydrolyse enzymatique douce.
- La présence d'au moins deux variants de l'histone H2A.
- La perte d'un site potentiel de phosphorylation dans l'un des deux variants où une sérine est remplacée par une alanine.

Toutes ces expériences de phosphorylation ont été conduites en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique et isolée du pancréas de Rat ou du muscle cardiaque de Porc.

Les sites de phosphorylation de l'histone H5, histone spécifique de l'érythrocyte nucléé, ont été déterminés en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique (kinase de pancréas de Rat) et d'une kinase non activée par l'AMP cyclique (kinase de plasmocytome de Souris). La phosphorylation de l'histone H5 observée dans ce dernier cas est similaire à celle observée *in vivo*.

La phosphorylation de l'histone H1 n'a pas été étudiée volontairement en raison du manque de connaissance de la structure primaire complète de cette histone.

Seule l'histone H3 est phosphorylée (au niveau de la sérine 10) dans la "core particle" lorsque l'octamère d'histones est associé à 146 paires de bases de DNA. C'est encore l'histone H3 seule qui est phosphorylée dans la chromatine d'érythrocyte de Poulet débarrassée des histones H1, H5 et des protéines non-histones.

Dans la chromatine native d'érythrocyte de Poulet, en présence de la kinase activée par l'AMP cyclique, les histones H3 et H5 sont intensément phosphorylées tandis que l'histone H1 ne l'est pratiquement pas. Les histones H2A, H2B, H4 sont des substrats pour la kinase lorsqu'elles sont isolées (H2A, H2B) ou sous forme de complexes. Au sein de la chromatine, elles ne sont pas phosphorylées parce que inaccessibles à l'enzyme.

La phosphorylation diminue les interactions entre histones et DNA et son influence sur la structure de la chromatine a pu être appréhendée par des méthodes immunochimiques qui permettent la mise en évidence de changements de configuration très subtils. La structure globale du nucléosome n'est pas atteinte mais des modulations dynamiques très fines ont été mises en évidence par immunologie quand les histones H3 et H5 sont phosphorylées.

Enfin la microscopie électronique a permis de visualiser une certaine " relaxation " de la chromatine après phosphorylation.

BIBLIOGRAPHIE DES CHAPITRES III, IV ET V

- ALLIS, C.D., GLOVER, C.V.C., BOWEN, J.K. and GOROVSKY, M.A. (1980)
Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*.
Cell, 20, 609-617.
- ARFMANN, H.A. and BODE, J. (1980)
Specificity of histone phosphorylation : influence of nucleosome structure.
Int.J.Biol.Macromol., 2, 109-112.
- BAILEY, G.S. and DIXON, G.H. (1973)
Histone IIb1 from rainbow trout. Comparison in amino acid sequence with calf thymus IIb1.
J.Biol.Chem., 248, 5463-5472.
- BRIAND, G., KMIECIK, D., SAUTIERE, P., WOUTERS, D., BORIE-LOY, O., BISERTE, G., MAZEN, A. and CHAMPAGNE, M. (1980)
Chicken erythrocyte histone H5. IV. Sequence of the carboxy-terminated half of the molecule (96 residues) and complete sequence.
FEBS Letters, 112, 147-151.
- COLE, R.D. (1977)
Special features of the structures of H1 histones. in "The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus" (TSO.P.O.P. ed) Vol.1, 93-104, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New-York.
- DELANGE, R.J., WILLIAMS, L.C. and MARTINSON, H.G. (1979)
Identification of interacting amino acids at the histone 2A-2B binding site.
Biochemistry, 18, 1942-1946.

- DE MURCIA,G., MAZEN,A., ERARD,M., POUYET,J. and CHAMPAGNE,M.
(1980)
Isolation and physical characterization of a stable
core particle.
Nucleic Acids Research, 8, 767-779.
- FRANKLIN,S.G. and ZWEIDLER,A. (1977)
Non-allelic variants of histones 2a,2b and 3 in
mammals.
Nature, 266, 273-275.
- GOLDKNOPF,I.L., WILSON,G., BALLAL,N.R. and BUSCH,H.(1980)
Chromatin conjugates protein A24 is cleaved and ubi-
quitin is lost during chicken erythropoiesis.
J.Biol.Chem., 255, 10555-10558.
- GURLEY,L.R. and WALTERS,R.A.(1973)
Evidence from Triton X-100 polyacrylamide gel electro-
phoresis that histone F2a2, not F2b is phosphorylated
in Chinese Hamster cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 55, 697-703.
- HASHIMOTO,E., TAKEDA,M., NISHIZUKA,Y., HAMANA,K. and IWAI,K.
(1975)
Phosphorylated sites of calf thymus histone H2B by
adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase
from silkworm.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 66, 547-555.
- HEWISH,D.R. and BURGOYNE,L.A. (1973)
Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin
DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribo-
nuclease.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 52, 504-510.
- KMIECIK,D., COUPPEZ,M., BELAÏCHE,D. and SAUTIERE,P.(1983)
Primary structure of histone H2A from nucleated erythro-
cyte of the marine worm *Sipunculus nudus*. Presence of
two forms of H2A in the sipunculid chromatin.
Eur.J.Biochem., 135, 113-121.
- KUROCHKIN,S.N., ANDREEVA,N.B., GASARYAN,K.G., SEVERIN,E.S. and
KURCHATOV,I.V. (1977)
Investigation of sites phosphorylated in histone H5 by
protein kinase from pig brain.
FEBS Letters, 76, 112-114.
- LAINE,B., SAUTIERE,P. and BISERTE,G. (1976)
Primary structure and microheterogeneities of rat chlo-
roleukemia histone H2A (Histone ALK,IIb1 or F2a2).
Biochemistry, 15, 1640-1645.

- LAEMMLI, U.K. and FAVRE, M. (1973)
Maturation of the Head of Bacteriophage T4 I DNA packaging events.
J.Mol.Biol., 80, 575-599.
- LANGAN, T.A. (1978)
Methods for the assessment of site-specific histone phosphorylation.
Methods Cell Biol., 19, 127-142.
- LUTTER, L.C. (1978)
Kinetic analysis of deoxyribonuclease I cleavages in the nucleosome core : evidence for a DNA superhelix.
J.Mol.Biol., 124, 391-420.
- NOLL, M., THOMAS, J.O. and KORNBERG, R.D. (1975)
Preparation of native chromatin and damage caused by shearing.
Science, 187, 1203-1206.
- NOMOTO, M., KYOGOKU, Y. and IWAI, K. (1982)
N-trimethylalanine, a novel blocked N-terminal residue of *Tetrahymena* histone H2B.
J.Biochem., 92, 1675-1678.
- PETTIGREW, G.W. and SMITH, G.M. (1977)
Novel N-terminal protein blocking group identified as dimethylproline.
Nature, 265, 661-662.
- QUIRIN-STRICKER, C. and SCHMITT, M. (1981)
Purification and characterization of a specific histone H1 protein kinase from Mouse plasmacytoma.
Eur.J.Biochem., 118, 165-172.
- SHLYAPNIKOV, S.V., ARUTYUNYAN, A.A., KUROCHKIN, S.N., MEMELOVA, L.V., NESTEROVA, M.V., SASHCHENKO, L.P. and SEVERIN, E.S. (1975)
Investigation of the sites phosphorylated in lysine-rich histones by protein kinase from pig brain.
FEBS Letters, 53, 316-319.
- STRICKLAND, M., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F., VON HOLT, C., WITTMANN-LIEBOLD, B. and LEHMANN, A. (1978)
The complete amino-acid sequence of histone H2B(3) from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*.
Eur.J.Biochem., 89, 443-452.
- STRICKLAND, W.N., STRICKLAND, M.S., DE GROOT, P.C. and VON HOLT, C. (1980)
The primary structure of histone H2A from the sperm cell of the sea urchin *Parechinus angulosus*.
Eur.J.Biochem., 109, 151-158.

- SUNG, M.T., DIXON, G.H. and SMITHIES, O. (1971)
Phosphorylation and synthesis of histones in regenerating rat liver.
J. Biol. Chem., 246, 1358-1364.
- SUNG, M.T. (1977)
Phosphorylation and dephosphorylation of histone V (H5): controlled condensation of Avian erythrocyte chromatin.
Biochemistry, 16, 286-290.
- SUNG, M.T. and FREEDLENDER, E.F. (1978)
Sites of *in vivo* phosphorylation of histone H5.
Biochemistry, 17, 1884-1890.
- TAYLOR, S.S. (1982)
The *in vitro* phosphorylation of chromatin by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem., 257, 6056-6063.
- THOMA, F., KOLLER, Th. and KLUG, A. (1979)
Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.
J. Cell Biol., 83, 403-427.
- TROSTLE-WEIGE, P.K., MEISTRICH, M.L., BROCK, W.A., NISHIOKA, K. and BREMER, J.W. (1982)
Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis.
J. Biol. Chem., 257, 5560-5567.
- VON HOLT, C., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F. and STRICKLAND, M.S. (1979)
More histone structures.
FEBS Letters, 100, 201-218.
- WEINTRAUB, H., PALTER, K. and VAN LENTE, F. (1975)
Histones H2a, H2b, H3 and H4 form a tetrameric complex in solutions of high salt.
Cell, 6, 85-110.
- WEST, M.H.P. and BONNER, W.M. (1980)
Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species.
Biochemistry, 19, 3238-3245.
- WHITLOCK, J.P., AUGUSTINE, R. and SCHULMAN, H. (1980)
Calcium-dependent phosphorylation of histone H3 in butyrate-treated Hela cells.
Nature, 287, 74-76.

- WILHELM, F.X., WILHELM, M.L., ERARD, M. and DAUNE, M.P. (1978)
Reconstitution of chromatin : assembly of the nucleosome.
Nucleic Acids Research, 5, 505-521.
- WOUTERS, D., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1978)
Primary structure of histone H2A from gonad of the sea urchin *Psammechinus miliaris*.
Eur.J.Biochem., 90, 231-239.
- WOUTERS-TYROU, D., MARTIN-PONTHIEU, A., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1982)
The amino-acid sequence of histone H2A from Cuttlefish *Sepia officinalis*.
Eur.J.Biochem., 124, 489-498.

ANNEXE

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B DE THYMUS DE VEAU ET PRINCIPAUX SITES DE MODIFICATION

^P Ac-Sér-Gly-Arg-Gly-Lys-Gln-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Sér-Arg-Ala-Gly-Leu-Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-
 10 20 30
^{Ac}
 His-Arg-Leu-Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Glu-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr-Leu-Thr-Ala-Glu-
 40 50 60
 Ile-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Asn-Ala-Ala-Arg-Asp-Lys-Lys-Thr-Arg-Ile-Ile-Pro-Arg-His-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-
 70 80 90
 Leu-Asn-Lys-Leu-Leu-Gly-Lys-Val-Thr-Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asn-Ile-Gln-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-Lys-Lys-Thr-Glu-Ser-His-
 100 110 120
^{Ub}

His-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys-(OH)

^{ADP-R} Pro-Glu-Pro-Ala-Lys-Ser-Ala-Pro-Ala-Pro-Lys-Lys-Gly-Ser-Lys-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-
 10 20 30
^P Sér-Arg-Lys-Glu-Sér-Tyr-Ser-Val-Tyr-Ser-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-
 40 50 60
 Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-
 70 80 90
 Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys-Tyr-Thr-Ser-Ser-
 100 110 120

Lys-(OH)



SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES HISTONES H3 ET H4 DE THYMUS DE VEAU ET PRINCIPAUX SITES DE MODIFICATION

H3:	(H)	-Ala-Arg-Thr-Lys-Gln-Thr-Ala-Arg-Lys-Ser-Thr-Gly-Gly-Lys-Ala-Pro-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-Thr-Lys-Ala-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Pro-	Me	P	Ac	Ac	Me	
			10	10	20	20	30	30
		Ala-Thr-Gly-Gly-Val-Lys-Lys-Pro-His-Arg-Tyr-Arg-Pro-Gly-Thr-Val-Ala-Leu-Arg-Glu-Ile-Arg-Arg-Tyr-Gln-Lys-Ser-Thr-Glu-Leu-Leu-			50	50	60	60
			40					
		Ile-Arg-Lys-Leu-Pro-Phe-Gln-Arg-Leu-Val-Arg-Glu-Ile-Ala-Gln-Asp-Phe-Lys-Thr-Asp-Leu-Arg-Phe-Gln-Ser-Ser-Ala-Val-Met-Ala-Leu-			80	80	90	90
			70					
		Gln-Glu-Ala-Cys-Glu-Ala-Tyr-Leu-Val-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp-Thr-Asn-Leu-Cys-Ala-Ile-His-Ala-Lys-Arg-Val-Thr-Ile-Met-Pro-Lys-Asp-			110	110	120	120
			100					
		Ile-Gln-Leu-Ala-Arg-Arg-Ile-Arg-Gly-Glu-Arg-Ala-(OH)			130			
			130					
<hr/>								
H4:		Ac-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Lys-Gly-Leu-Gly-Lys-Gly-Ala-Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-Leu-Arg-Asp-Asn-Ile-Gln-Gly-Ile-Thr-	P	Ac	Ac	Me		
			10	10	20	20	30	30
		Lys-Pro-Ala-Ile-Arg-Arg-Leu-Ala-Arg-Arg-Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Ile-Ser-Gly-Leu-Ile-Tyr-Glu-Glu-Thr-Arg-Gly-Val-Leu-Lys-Val-Phe-			50	50	60	60
			40					
		Leu-Glu-Asn-Val-Ile-Arg-Asp-Ala-Val-Thr-Tyr-Thr-Glu-His-Ala-Lys-Arg-Lys-Thr-Val-Thr-Ala-Met-Asp-Val-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-			80	80	90	90
			70					
		Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly-(OH)			100			
			100					



SEQUENCE EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H5 D'ERYTHROCYTE DE POULET ET SITES DE PHOSPHORYLATION

(H)-Thr-Glu-Ser-Leu-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Lys-Pro-Lys-Gln-Val-Lys-Ala-Ser-Arg-Arg-Ser-Ala-Ser-His-Pro-Thr-Tyr-Ser-Glu-^P 30

Met-Ile-Ala-Ala-Ile-Arg-Ala-Glu-Lys-Ser-Arg-Gly-Ser-Ile-Gln-Ser-Ile-Lys-Tyr-Ile-Lys-Ser-His-Tyr-Lys-Val-Gly-^P 60

His-Asn-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Lys-Leu-Ser-Ile-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-^P 90

Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp-Lys-Ala-Lys-Arg-Ser-Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-Ala-Val-Arg-Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Arg-^P 120

Pro-Arg-Lys-Ala-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-Ala-Arg-Lys-Lys-Ser-Arg-Ala-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-^P 150

Pro-Lys-Thr-Val-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg-Lys-Ala-Lys-Lys-Val-Lys-Arg-Ser-Lys-Pro-Arg-Ala-Lys-Ser-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-^P 180

Pro-Lys-Lys-Lys-(OH)



Ⓟ : Sites de phosphorylation en présence d'une kinase non activée par l'AMP cyclique

P : Sites de phosphorylation en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique

RESUME

Au sein de la chromatine, les histones H2A et H2B interagissent pour former le dimère H2A-H2B, élément constitutif du nucléosome. La détermination de la structure primaire de ces histones isolées d'un invertébré marin, l'Etoile de mer *Asterias rubens*, met en évidence des variations structurales dans les régions basiques de ces histones et en particulier, dans l'histone H2B, cette zone de la protéine ne présente aucune analogie avec celle de l'histone homologue de mammifères. L'histone H2B est en outre caractérisée par la présence d'un résidu de diméthylproline à son extrémité N-terminale. Le blocage par méthylation est rarement observé chez les histones et l'histone H2B elle-même a généralement son extrémité N-terminale libre; par ailleurs, la présence de microhétérogénéité dans l'histone H2A d'Etoile de mer conduit, pour l'un des variants à la perte d'un site important de phosphorylation.

La phosphorylation, modification post-synthétique importante, est étudiée dans les histones isolées, dans les complexes d'histones et dans la chromatine d'érythrocyte de Poulet en présence d'une kinase activée par l'AMP cyclique. Dans la chromatine native, les histones H3 et H5 sont intensément phosphorylées tandis que l'histone H1 ne l'est pratiquement pas. L'importance de la phosphorylation de ces histones sur la structure de la chromatine est montrée en microscopie électronique et par l'emploi de méthodes immunochimiques.

Enfin, la spécificité des kinases activée- et non activée par l'AMP cyclique est mise en évidence avec l'histone H5, histone spécifique de l'érythrocyte nucléé où les sites de phosphorylation en présence d'une kinase associée à la croissance et non activée par l'AMP cyclique, sont identiques à ceux observés *in vivo*.

MOTS-CLEFS

HISTONE/STRUCTURE PRIMAIRE/KINASE/PHOSPHORYLATION/CHROMATINE