

50376
1985
17

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

Année 1985

N° d'ordre : 645

THÈSE

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

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES OPTION BIOCHIMIE

par

Daniel KMIECIK



ÉTUDES STRUCTURALES D'HISTONES D'INVERTÉBRÉS MARINS

**HISTONE H2A DE L'ÉRYTHROCYTE DE SIPONCLE
HISTONE H1 SPÉCIFIQUE DU SPERME DE *PLATYNEREIS DUMERILII***

présentée le 11 mars 1985 devant la Commission d'Examen

Président : Professeur J. MONTREUIL

Rapporteurs : Professeur J. KREMBEL

Professeur J.A. SUBIRANA

Docteur P. SAUTIÈRE

Examineurs : Professeur G. BISERTE

Professeur Y. LE GAL

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. 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, COR-
DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,
GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG,
LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU,
ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

MM. 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. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
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.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographi
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé- riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
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. 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

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS</u>	8
I - 1 <u>STRUCTURE DE LA CHROMATINE DES EUCARYOTES</u>	9
I - 1-1 Le nucléosome ou la sous-unité desoxyribo- nucléoprotéique de base	10
I - 1-1-1 Mise en évidence. Définition	10
I - 1-1-2 Structure de la "core particle"	11
I - 1-1-3 La structure nucléosomique : "core particle + histone H1	21
I - 1-2 La structure polynucléosomique ou super- structure de la chromatine	25
I - 2 <u>CHROMATINE CONDENSÉE ET HISTONES H1 SPÉCIFIQUES</u>	27
I - 3 <u>ORGANISATION DE LA CHROMATINE DES SPERMATOZOÏDES : REMPACEMENT DES HISTONES PAR LES PROTAMINES</u>	30
I - 3-1 Caractéristiques structurales des prota- mines	30
I - 3-2 Interactions DNA-protamines	33
I - 3-2-1 Chromatine de spermatozoïdes ne renfer- mant que des protamines	33
I - 3-2-2 Chromatine de spermatozoïdes renfermant à la fois des histones et des protamines	38
I - 3-3 Phénomène de maturation du spermatozoïde. Mise en évidence de protéines intermédiaires entre les histones et les protamines	38
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	43

CHAPITRE II : <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	55
II - 1 <u>SEQUENCE COMPLETE DE L'HISTONE H2A DE L'ERYTHRO- CYTE NUCLEE DE SIPONCLE (<i>SIPUNCULUS NUDUS</i>)</u>	58
<i>PUBLICATION N°1</i>	
Commentaire	59
Bibliographie	63
II - 2 <u>CARACTERISATION DES PROTEINES BASIQUES : HISTONES ET PROTAMINES DU SPERME DE <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i></u>	65
<i>PUBLICATION N°2</i>	
Commentaire	66
Bibliographie	69
II - 3 <u>SEQUENCE COMPLETE DES DEUX VARIANTS DE L'HISTONE H1 SPECIFIQUE DU SPERME DE <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i></u>	71
<i>PUBLICATION N°3</i>	
Commentaire	72
Bibliographie	79
<u>PERSPECTIVES</u>	81

"Employez le temps, il nous échappe si vite ! cependant l'ordre vous apprendra à en gagner. Mon bon ami, je vous conseille avant tout le cours de logique. Là on vous dressera bien l'esprit, on vous l'affublera de bonnes bottes espagnoles, pour qu'il trotte prudemment dans le chemin de la routine, et n'aille pas se promener en zigzag comme un feu follet. Ensuite, on vous apprendra tout le long du jour que pour ce que vous faites en un clin d'oeil, comme boire et manger, un, deux, trois, est indispensable. Il est de fait que la fabrique des pensées est comme un métier de tisserand, où un mouvement du pied agite des milliers de fils, où la navette monte et descend sans cesse, où les fils glissent invisibles, où mille noeuds se forment d'un seul coup : le philosophe entre ensuite, et vous démontre qu'il doit en être ainsi : le premier est cela, le second cela, donc le troisième et le quatrième cela ; et que si le premier et le second n'existaient pas, le troisième et le quatrième n'existeraient pas davantage. Les étudiants de tous les pays prisent fort ce raisonnement, et aucun d'eux pourtant n'est devenu tisserand. Qui veut reconnaître et détruire un être vivant commence par en chasser l'âme : alors il en a entre les mains toutes les parties ; mais, hélas ! que manque-t-il ? rien que le lien intellectuel. La chimie nomme cela *encheiresin naturae* ; elle se moque ainsi d'elle-même, et l'ignore".

Méphistophélès

GOETHE "Faust" (Cabinet d'Etude)

Ce travail a été commencé dans la cadre de l'Unité 124 de l'INSERM (Directeur: Pr.Gérard BISERTE) sous la direction de Pierre SAUTIERE Maître de Recherches au CNRS. Depuis le 1er janvier 1984, Pierre SAUTIERE a pris la direction de l'Unité de Recherche Associée au CNRS N°409 : Structure et Interaction des protéines associées au DNA des eucaryotes et des procaryotes.

Ce mémoire est pour moi l'occasion d'exprimer ma gratitude envers tous ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail et plus particulièrement envers mon directeur de Recherches Pierre SAUTIERE en qui j'ai toujours trouvé écoute et compréhension.

Je remercie Daniel SELLOS qui a assuré la préparation de l'histone H1 spécifique du sperme de *Platynereis dumerilii*.

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

Je suis entré à l'Unité 124 de l'INSERM (Directeur : Professeur G.BISERTE) le 1er octobre 1972 dans l'intention de préparer un D.E.A. de Biochimie au sein de l'équipe de recherches sur la structure des protéines basiques de la chromatine dirigée par Pierre SAUTIERE (Maître de recherches au CNRS).

Dès mes études universitaires, j'avais ressenti un intérêt profond pour les protéines. Il est utile de rappeler ici que le nom de protéine a été donné par les chercheurs du XIXe siècle à ces "substances modelantes"- ainsi les qualifiait encore LIEBIG - et que ce mot est issu du grec "protéios" qui signifie le premier et le plus important.

Ces macromolécules sont impliquées dans tous les mécanismes fondamentaux de la vie assurant la régénération et la reproduction:

- Elles forment les structures des organites cellulaires.
- Elles sont le support de toutes les activités enzymatiques, expression du métabolisme cellulaire.
- Elles contribuent à l'expression de l'information génétique en maintenant la pérennité de cette information dans le temps et dans l'espace (Réplication - Transcription - Traduction).

Un siècle d'études physico-chimiques consacré à l'hémoglobine et résumé dans le livre de Claude DEBRU (1983) "L'Esprit des protéines" (Ed.HERMANN) montre la richesse du concept de protéine. Pour l'étude de l'hémoglobine, qui constitue un modèle, les chercheurs et en particulier PERUTZ ont pu disposer de cristaux de ces molécules et les soumettre à l'analyse par diffraction des rayons X jusqu'à une très haute résolution. A la même époque la chimie des protéines avait permis d'envisager la connaissance complète de leur structure primaire (citons

en particulier la remarquable et fondamentale contribution de la méthode de dégradation récurrente de P.EDMAN, 1950) permettant ainsi la pleine exploitation des méthodes de la physique.

Dans le cas des histones, l'étude de la séquence en acides aminés de ces molécules a permis l'accumulation d'une somme considérable d'informations. Malheureusement ces molécules demeureraient réfractaires à la cristallisation en raison de leur pH_i très élevé. Récemment (1980) la cristallisation de l'octamère d'histones en solution a permis de compléter les informations accumulées par les biochimistes et nous avons maintenant une idée claire de la sous-unité de base de la chromatine : le nucléosome. Concernant la conceptualisation de ce modèle nucléosomique que nous présenterons dans nos généralités, il faut souligner l'importance des méthodes de pontage chimique histone-DNA et histone-histone, et là encore c'est parce que les chercheurs ont pu pleinement exploiter les résultats des méthodes de pontage (Ces mêmes méthodes pratiquées sur le ribosome s'étaient révélées très fécondes dans la compréhension de la structure des sous-unités 30S et 50S).

Notre participation au progrès des connaissances se situe précisément dans l'étude de la structure primaire des histones.

C'est ainsi que dès mon arrivée au laboratoire, Pierre SAUTIERE me confia l'étude de l'histone H5 spécifique de l'érythrocyte nucléé de Poulet. L'intérêt de ce travail résidait dans la compréhension du rôle de ce variant d'histone H1, dont l'apparition dans l'érythrocyte nucléé était lié à un phénomène de maturation. Le travail de détermination de la structure primaire a été mené conjointement par Gilbert BRIAND, Odile BORIELOY et moi-même, chacun d'entre-nous utilisant des voies d'approche différentes mais complémentaires pour résoudre le problème ainsi posé. Ces recherches commencées au sein d'une Action Coordonnée et Concertée de la DGRST se sont poursuivies dans le cadre d'une Action Thématique Programmée "Chromatine"

du CNRS (N°2875) et ont été menées en collaboration avec le groupe de Biophysique de l'I.B.M.C. du CNRS de Strasbourg dirigé par Michel DAUNE et Madeleine CHAMPAGNE. Ce travail a fait l'objet de ma thèse de 3ème cycle (KMIECIK, 1976) présentée le 8 juillet 1976.

A mon retour du service national en octobre 1977 j'ai obtenu un poste d'attaché de recherche au CNRS et j'ai dans un premier temps contribué à achever la détermination de la séquence de l'histone H5 dont Gilbert BRIAND avait la responsabilité, sujet de sa thèse de Doctorat d'Etat qu'il soutint le 11 mai 1981.

Dès 1979 j'avais abordé l'étude des histones H2A et H2B de l'érythrocyte de Siponcle (*Sipunculus nudus*). Les travaux initiaux menés sous l'instigation du Professeur G.BISERTE avaient pour but la recherche dans cet érythrocyte primitif nucléé d'une histone homologue à H5. En fait la chromatine de cet érythrocyte renferme outre les histones de type somatique classique une histone H1°, que nous avons isolée et caractérisée avec Thierry DUPRESSOIR, qui pourrait bien avoir dans cet érythrocyte un rôle comparable à celui de l'histone H5 dans l'érythrocyte de Poulet. En ce qui concerne les histones H2A et H2B, la détermination de leur structure primaire s'intègre dans une activité importante au laboratoire : l'étude comparative des histones H2A et H2B d'espèces différentes judicieusement choisies en raison de leur position sur l'arbre phylogénétique.

Nous avons déterminé la séquence des 123 résidus d'acides aminés de l'histone H2A de l'érythrocyte de Siponcle et démontré que cette protéine est naturellement présente sous forme phosphorylée (N-Acetyl-Phosphoryl-Seryl-1) à un taux de 60 p. 100 dans la chromatine de l'érythrocyte de Siponcle. L'étude de l'histone H2B n'a pu encore aboutir en raison des difficultés de préparation de cette protéine.

En 1980 s'est établie une collaboration fructueuse avec Daniel SELLOS et Yves LE GAL (Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France). Cette collaboration consiste en l'isolement et la caractérisation des protéines basiques des spermatozoïdes d'invertébrés marins (Huître, Crevette, Annélide). Cette activité s'inscrit également dans un programme de recherches coordonnées et concertées sur "l'Organisation du matériel génétique dans le gamète mâle" de quelques espèces animales (RCP.CNRS 680).

Daniel SELLOS et moi-même avons montré que d'une façon générale, toutes les histones de type somatique sont présentes dans le spermatozoïde des invertébrés marins comme l'Huître (*Grassostrea gigas*), la Crevette (*Palaemon serratus*) et un annélide (*Platynereis dumerilii*). Les histones H1 cependant renferment plus d'arginine que leurs homologues isolées des vertébrés supérieurs. La chromatine des spermatozoïdes de *Platynereis dumerilii* apparaît extrêmement condensée. Elle renferme des protamines (15 p.100) et des histones (85 p.100) parmi lesquelles une histone H1 spécifique, anormalement courte (119, 121 résidus) dont la composition en acides aminés ressemble à celle de l'histone H5.

Y-a-t-il une similitude entre le rôle de l'histone H5 dans la condensation de la chromatine de l'érythrocyte de Poulet, lors de l'érythropoïèse, et le rôle de l'histone H1 spécifique (et des protamines) dans la condensation de la chromatine dans le spermatozoïde mûr ?

Telle est la question qui nous a incités à étudier les "intervenants" moléculaires de la chromatine du sperme de *Platynereis*, afin d'approfondir les homologues éventuelles. Nous avons déterminé la séquence des deux variants de l'histone H1 spécifique et commencé l'étude des protamines.

En conclusion nous pensons que ce travail de connaissance des structures primaires des histones est un acquis nécessaire à la compréhension de la structure et de la fonction de la chromatine.

- Les résultats ainsi obtenus s'intègrent dans un ensemble d'informations faisant évoluer les concepts et précisant les limites de validité des modèles explicatifs choisis pour rendre compte du rapport structure-fonction.

- La détermination d'une séquence de protéine n'est jamais une fin en soi, elle débouche sur la préparation de fragments peptidiques correspondant aux domaines de la protéine doués d'une fonction biologique précise (domaines d'interactions protéine-protéine ; déterminants antigéniques).

- Chez les Eucaryotes, les progrès considérables dans la connaissance de la séquence en bases du gène correspondant à une protéine n'ont jamais mis en doute la nécessité d'obtenir des informations sur la chimie de la protéine "fonctionnelle", pour faciliter la lecture du gène correspondant mais aussi pour connaître les modifications post-synthétiques dont la protéine synthétisée est le siège... bien que l'information correspondante ne figure pas sur le gène.

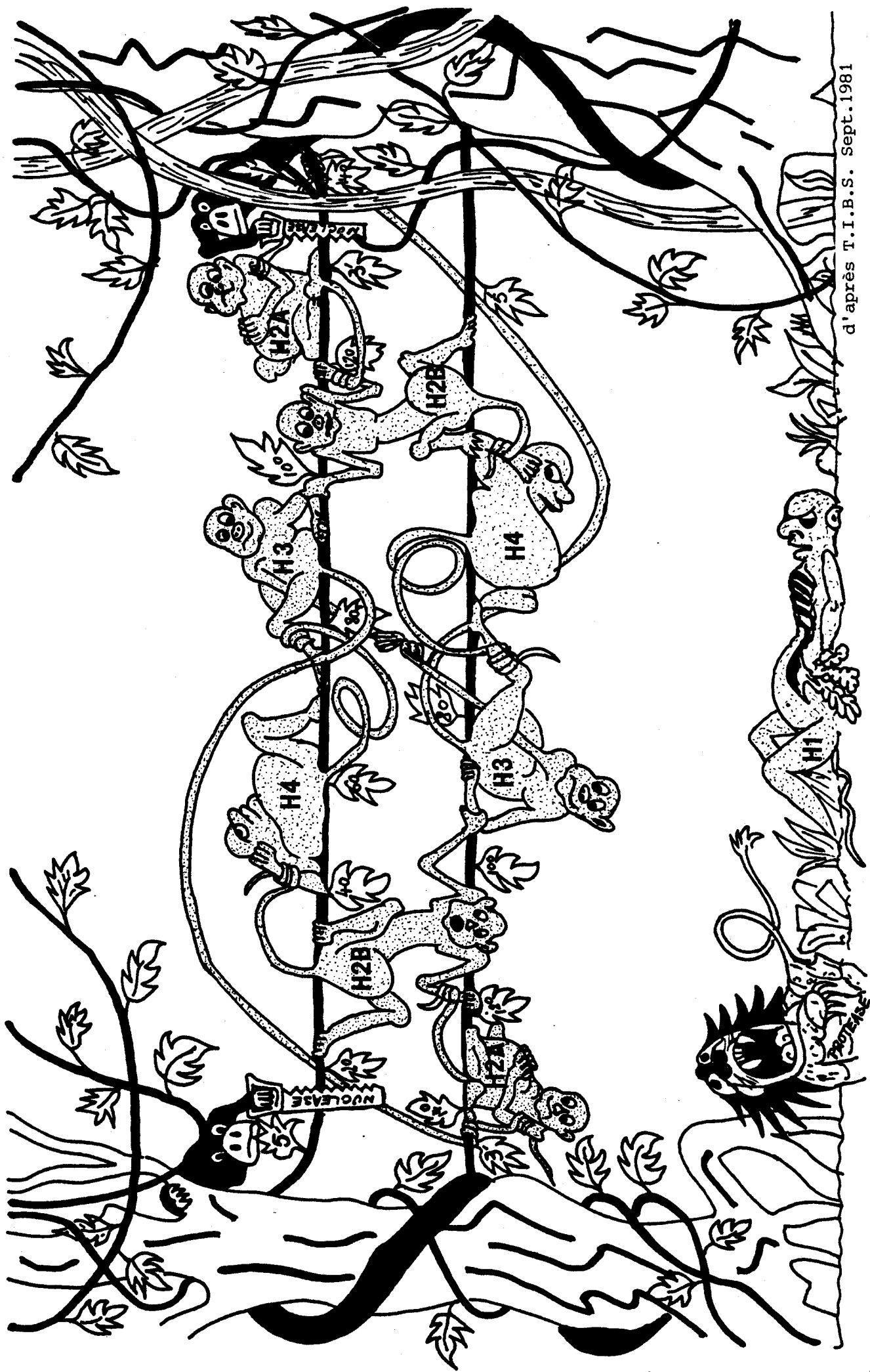
Lille, mai 1984

LISTE DES PUBLICATIONS

- 1 - Chicken erythrocyte histone H5. I - Amino-terminal sequence (70 residues).
A.GAREL, A.MAZEN and M.CHAMPAGNE
P.SAUTIERE, D.KMIECIK, O.LOY and G.BISERTE (1975)
FEBS Letters 50, 195-199.
- 2 - Chicken erythrocyte histone H5. II - Amino acid sequence adjacent to the phenylalanine residue.
P.SAUTIERE, D.KMIECIK, O.LOY, G.BRIAND and G.BISERTE
A.GAREL and M.CHAMPAGNE (1975)
FEBS Letters 50, 200-203.
- 3 - Chicken erythrocyte histone H5. III - Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues).
P.SAUTIERE, G.BRIAND, D.KMIECIK, O.LOY and G.BISERTE
A.GAREL and M.CHAMPAGNE (1976)
FEBS Letters 63, 164-166.
- 4 - Primary structure of chicken erythrocyte histone H2A.
B.LAINE, D.KMIECIK, P.SAUTIERE and G.BISERTE (1978)
Biochimie 60, 147-150.
- 5 - Complete amino acid sequence of DNA-binding proteins HU-1 and HU-2 from *Escherichia coli*.
B.LAINE, D.KMIECIK, P.SAUTIERE, G.BISERTE and M.COHEN-SOLAL (1980)
Eur.J.Biochem. 103, 447-461.
- 6 - Chicken erythrocyte histone H5. IV - Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence.
G.BRIAND, D.KMIECIK, P.SAUTIERE, D.WOUTERS, O.BORIE-LOY, G.BISERTE, A.MAZEN and M.CHAMPAGNE (1980)
FEBS Letters 112, 147-151.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS



d'après T.I.B.S. Sept. 1981

I - 1 STRUCTURE DE LA CHROMATINE DES EUCARYOTES

L'ensemble du DNA (1 m à 1,74 m) d'une cellule eucaryote est compacté dans les limites de quelques microns du noyau cellulaire. Ce gigantesque "sac de noeuds" à l'échelle de la cellule est réalisé par les histones, protéines basiques en interactions électrostatiques avec le DNA. Une telle structure chromatinienne, malgré sa complexité, se double à chaque division cellulaire accompagnant les phénomènes de différenciations cellulaires. Une cellule différenciée utilise à peu près 10 à 20 p.100 (selon son origine) de l'information génétique contenu dans son DNA pour ses besoins physiologiques. En considérant cette relativement faible quantité de gènes que la cellule doit mettre "sous la main" des enzymes de la transcription, il suffirait pour ce faire que ces gènes soient situés à la périphérie de la masse chromatinienne. Dès lors la différenciation aurait comme corollaire inévitable le remaniement de toute la chromatine dans le but d'exposer de préférence à la périphérie du labyrinthe chromatinien les gènes nécessaires à la cellule. C'est dire l'importance de la connaissance de la structure physico-chimique de ce complexe desoxyribonucléique.

Un cas limite de différenciation cellulaire est illustré par l'érythrocyte nucléé (amphibiens, oiseaux, poissons, reptiles) ou encore le gamète mâle chez lesquels apparaissent des protéines spécifiques (histones ou protamines) liées de près ou de loin à un phénomène de condensation et d'inactivation de la chromatine.

Nous aurons donc à décrire les différents niveaux de compaction du DNA et à nous intéresser aux protéines responsables de cette compaction.

I - 1-1 LE NUCLEOSOME OU LA SOUS-UNITE DESOXYRIBONUCLEOPROTEIQUE DE BASE

MAC GHEE et FELSENFELD, 1980, ont fait une remarquable étude synthétique sur la sous-unité répétitive de la chromatine.

I - 1-1-1 Mise en évidence. Définition

La digestion de la chromatine par une endonucléase extraite du staphylocoque a permis de mettre en évidence une structure répétitive par coupure du DNA. Les fragments du DNA de cette structure contenaient 200 paires de bases (pb) ou des multiples de cette longueur (HEWISH et BURGOYNE, 1973) OLINS et OLINS, 1974 ; OUDET et coll., 1974 observent en microscopie électronique des structures globulaires répétitives évoquant des "perles sur un fil" ou "collier de perles" et les nomment nucléosomes.

Le nucléosome obtenu à partir de la plupart des chromatines de cellules eucaryotes est un complexe désoxyribonucléoprotéique contenant 195 ± 5 pb de DNA enroulées autour d'un octamère d'histones, lui-même formé d'un tétramère (H3-H4)₂ et de deux dimères (H2A-H2B) auquel s'ajoute une molécule d'histone H1 (KORNBERG, 1974).

Toutefois des variations de la longueur du DNA des nucléosomes étaient observées selon l'origine de la chromatine. Dès cette époque on avait reconnu à l'histone H1 une situation et un rôle différents des autres histones. NOLL et KORNBERG (1977) parviennent à définir deux structures communes à toutes les chromatines quelle que soit leur origine.

- Un nucléosome minimum qui renferme 168 pb, l'octamère d'histone et une histone H1 que SIMPSON (1978) appellera chromatosome.
- La "core particle" qui consiste en l'octamère d'histone autour duquel s'enroulent 146 pb de DNA (1,75 tour) (PRUNELL et coll., 1979).

Ces deux structures sont présentes dans toutes les chromatines d'eucaryotes. La comparaison de ces deux structures fait ressortir que l'histone H1 s'associe à 20 pb dans le chromatosome.

I - 1-1-2 Structure de la "core particle"

Approche biophysique : définition de la forme

Une telle structure répétitive se prêtait bien aux études biophysiques qui ont permis de préciser les positions respectives du DNA et de l'octamère d'histones.

La structure de la "core particle" en solution a été abordée par la méthode de variation des contrastes en diffusion des neutrons (SUAU et coll., 1977) (BRADDOCK et coll., 1981). La microscopie électronique et la diffraction des rayons X (FINCH et coll., 1981) ainsi que la diffraction des neutrons (BENTLEY et coll., 1981) ont permis d'étudier la structure de la "core particle".

L'ensemble de ces études montre que la "core particle" se présente sous la forme d'un disque aplati de 11 nm de diamètre et de 5,5 à 6 nm d'épaisseur. 1,75 tour de DNA est enroulé selon un pas de 30 Å en solution (28 Å dans le cristal) autour de l'octamère d'histones ayant la forme d'une rampe hélicoïdale (FINCH et coll., 1981).

La figure 1 représente le modèle proposé par BRADDOCK et coll. (1981).

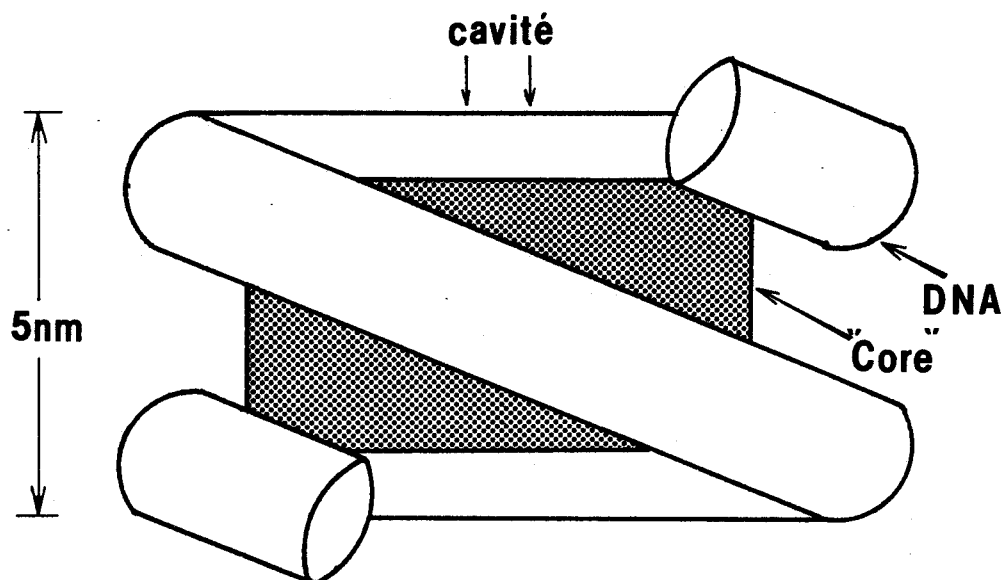


FIGURE 1 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA "CORE PARTICLE"

Les histones forment un "core" cylindrique légèrement tronqué. En son centre, une cavité d'un diamètre de 1 nm environ apparaît dont l'axe est confondu avec l'axe de la superhélice de DNA. (Les extrémités N- et C-terminales des chaînes d'histones demeurent extérieures cependant à ce core apolaire). 1,7 tour de DNA est enroulé autour du core protéique selon un pas de 3-3,5 nm.

D'après BRADDOCK et coll. (1981)

Organisation des histones dans la "core particle"

Existence de complexes préférentiels d'histones

Tandis que THOMAS et KORNBERG (1975) pontaient les histones par le diméthylsuberimide en milieu de force ionique élevé et retrouvaient une structure octamérique, EICKBUSCH et MOUDRIANAKIS (1978) tenant compte des forces d'interactions relatives (H3—H4; H2A—H2B; H2B—H4) proposaient un modèle de "core particle" formé du tétramère (H3-H4)₂ lié par des liaisons hydrogène à deux dimères (H2A-H2B).

Ce modèle qui tient compte des forces d'associations préférentielles des histones est séduisant car il explique pourquoi le tétramère (H3-H4)₂ est suffisant pour enrouler le DNA et former des structures semblables à celles du nucléosome. Les histones H2A et H2B assument un rôle stabilisateur dans cette structure.

Un autre aspect intéressant à observer, c'est que l'on peut ainsi comprendre la très grande conservation des structures primaires des histones H3 et H4 en la reliant à une contrainte d'ordre structural telle que la décrivaient EICKBUSCH et MOUDRIANAKIS dans leur modèle. La plus grande variabilité des séquences primaires des histones H2A et H2B peut être admise dans la mesure où ces protéines n'ont pas un rôle fondamental ; elles contribuent cependant à stabiliser la structure nucléosomique.

Caractéristiques structurales générales des histones

La figure 2 résume l'ensemble des caractéristiques structurales des histones. D'une façon générale les histones sont des protéines dont la séquence primaire est dissymétrique :

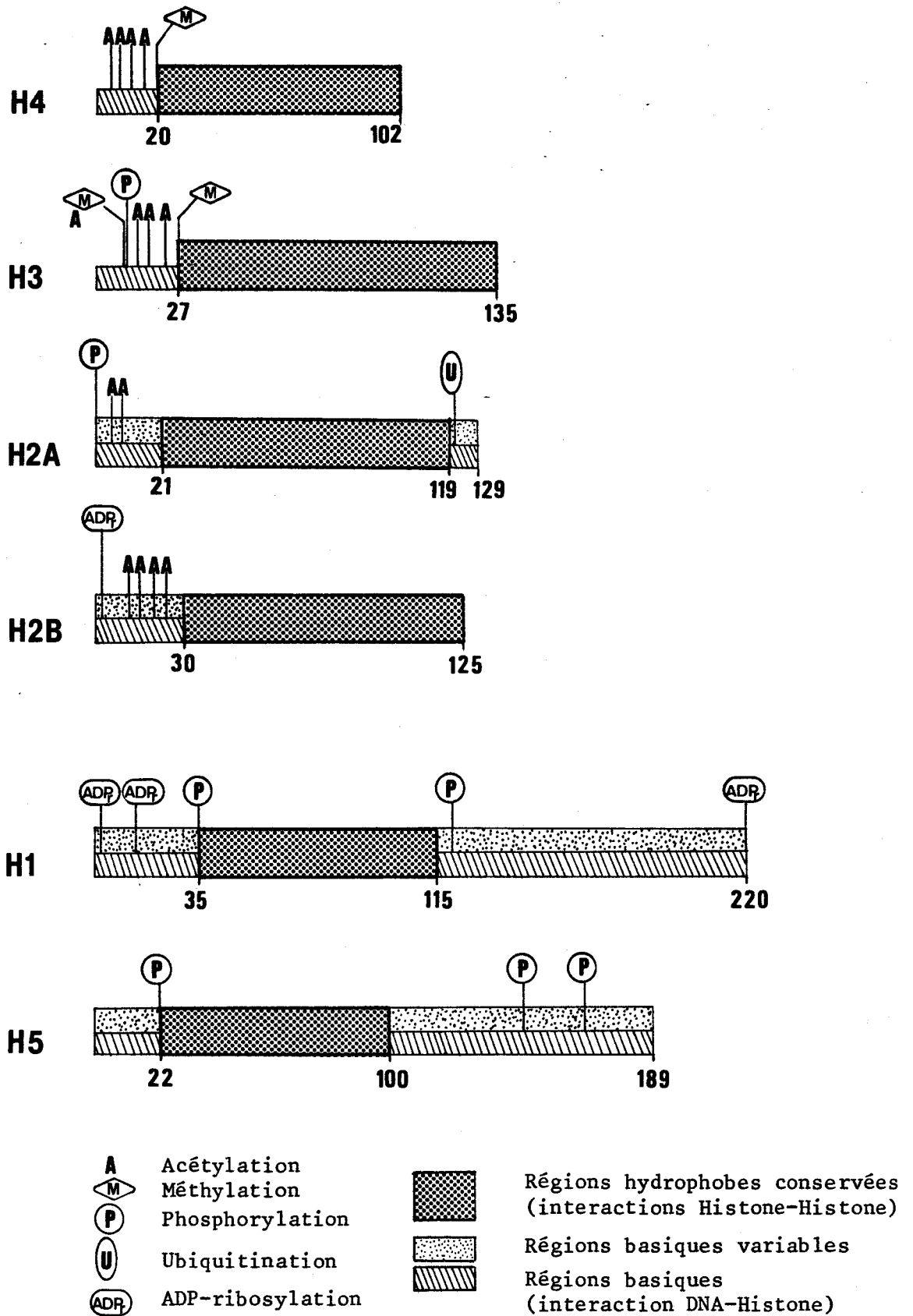


FIGURE 2 CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES HISTONES

- 70 p.100 des résidus de lysine des histones de la "core particle" (H3, H4, H2A et H2B) sont situés dans leur région N-terminale.

- H2A et H2B renferment en outre une région C-terminale très basique.

- Les régions centrales de ces molécules sont riches en résidus hydrophobes et renferment toute leur structure tertiaire.

Nous verrons plus loin le cas de l'histone H1.

Ces caractéristiques font qu'une molécule d'histone n'est pas totalement globulaire, elle possède bien une zone de structure globulaire mais aussi des zones de structure non définie qui n'acquièrent leur structure définitive qu'en interaction avec les groupes phosphates du DNA.

Les études phylogénétiques menées sur les histones montrent que les variations de séquences se situent dans les régions N- et C-terminales pour H2A et H2B et H1. Les régions hydrophobes cruciales pour l'organisation de l'octamère, ne tolèrent que des changements conservatifs, au demeurant peu nombreux. Ces régions apolaires maintiennent la stabilité des complexes et en particulier 42-120 de H3 interagit avec 38-102 de H4 dans le tétramère (H3-H4)₂ ; 18-118 de H2A interagit avec 32-114 de H2B dans le dimère H2A-H2B (MOSS et coll., 1976 ; BRADBURY et coll., 1978).

Les histones sont sujettes à des modifications post-synthétiques : acétylation, phosphorylation, méthylation, ADP-ribosylation et ubiquitination (MARTINAGE, 1984). Les modifications les plus importantes et les mieux étudiées sont l'acétylation et la phosphorylation.

- L'acétylation concerne essentiellement les histones H3 et H4 et à un degré moindre les histones H2A et H2B. Elle s'effectue au niveau du groupe ϵ -aminé des résidus de lysine situés dans la séquence N-terminale basique de ces protéines.

- La phosphorylation concerne surtout les histones H1 et H5 qui lui est apparentée mais aussi H3, H2A et H2B. Elle s'effectue au niveau des résidus de sérine.

L'acétylation des histones est reliée à la réplication du DNA comme l'ont montré JACKSON et coll.(1975) et CHAHALL et coll.(1980). Elle est également reliée à la transcription du DNA en mRNA (CHAHALL et coll.,1980 ; ALLFREY,1977) et au remplacement des histones par les protamines au cours de la spermatogénèse (DIXON et coll.,1974).

La phosphorylation a pu être reliée aux différentes étapes de la multiplication cellulaire, l'histone H1 en particulier est superphosphorylée juste avant le déclenchement de la mitose et c'est même une condition nécessaire mais non suffisante (MARTINAGE,1984). L'histone H3 est phosphorylée et, comme H1, associée à des chromosomes hautement condensés (Métaphase).

Les sites de phosphorylation et d'acétylation des histones de la "core particle" sont localisés dans les extrémités basiques N-terminales de ces protéines, extrémités qui restent libres à la périphérie du cylindre d'octamère. Ces régions peuvent être éliminées par hydrolyse trypsique limitée de la chromatine sans modifier pour autant la forme cylindrique de la "core particle" (WEINTRAUB et VAN LENTE,1974). Nous reviendrons sur cette caractéristique des extrémités des histones de la "core particle", mais il est facile d'entrevoir l'importance de ces régions qui interagissent avec le "DNA-linker" ou le DNA d'un nucléosome voisin, dès lors que des modifications chimiques réversibles comme l'acétylation et la phosphorylation entraînent un relâchement de l'interaction avec le DNA et une plus grande accessibilité du DNA nucléosomique aux enzymes de réplication ou de transcription.

Pontages chimiques-DNA-histones. Le positionnement des histones sur le DNA

La connaissance de la structure primaire de toutes les histones de la "core particle" a permis à MIRZABEKOV et coll. (1978) de réaliser une carte complète de la distribution des histones le long du DNA au moyen d'une méthode de pontage des résidus de lysine au DNA (Figure 3). Cette technique astucieuse permet de placer les histones par rapport à l'extrémité de chaque brin de DNA. MIRZABEKOV a mis en exergue les caractéristiques suivantes du complexe DNA-histones :

- L'existence d'un exemplaire de chaque histone par brin de DNA, ce qui suggère la présence d'un axe de symétrie dans la structure nucléosomique. Cette symétrie peut par ailleurs, expliquer les sites du DNA résistants à l'hydrolyse par la DNase I (30,60,80 et 110 de l'extrémité 5' du DNA), ces sites étant en interaction avec les histones.

- Les histones interagissent avec des segments de 6 nucléotides du DNA espacés régulièrement par 4 nucléotides. Cela permet d'expliquer la périodicité de 10 nucléotides des sites du DNA hydrolysés par les DNases (MIRZABEKOV,1980).

- L'absence d'histone sur les 20 premiers nucléotides (5' 3') de chaque brin de DNA.

- Lorsque le pontage histones-DNA est réalisé sur la "core particle", l'histone H2A se retrouve en interaction avec la région centrale et terminale de chaque brin de DNA. Cependant le même pontage réalisé sur le nucléosome ("core particle" + H1) ne permet plus de retrouver l'histone H2A en interaction avec la zone médiane des brins de DNA. Cela suggère déjà la proximité de l'histone H2A et de l'histone H1 sur laquelle nous reviendrons plus loin.

- Un autre aspect intéressant des travaux de MIRZABEKOV consiste dans la démonstration que les histones sont localisées du même côté de la double hélice : elles sont liées aux groupes

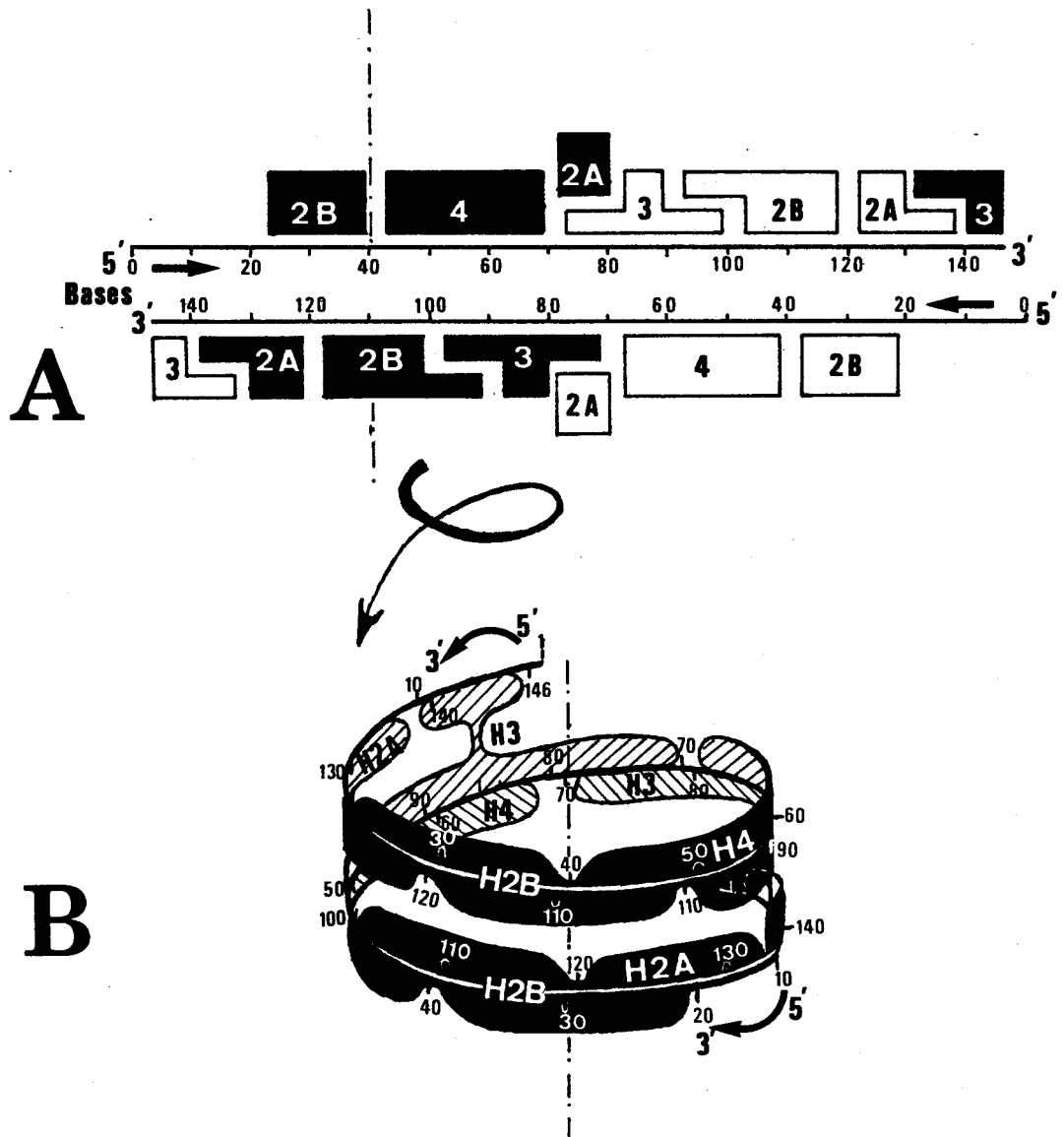


FIGURE 3

A - MODÈLE MONTRANT L'ARRANGEMENT DES HISTONES LE LONG DE LA DOUBLE HÉLICE DE DNA DE LA "CORE PARTICLE".

B - LE MÊME MODÈLE ENROULÉ : LE DNA FORME UNE SUPERHÉLICE GAUCHE DE 80 PAIRES DE BASES PAR TOUR.

(Les sites de liaison de H2A (75), H2B (95) et H3 (135) ne sont pas indiqués afin de ne pas surcharger la figure)

D'après MIRZABEKOV (1981)

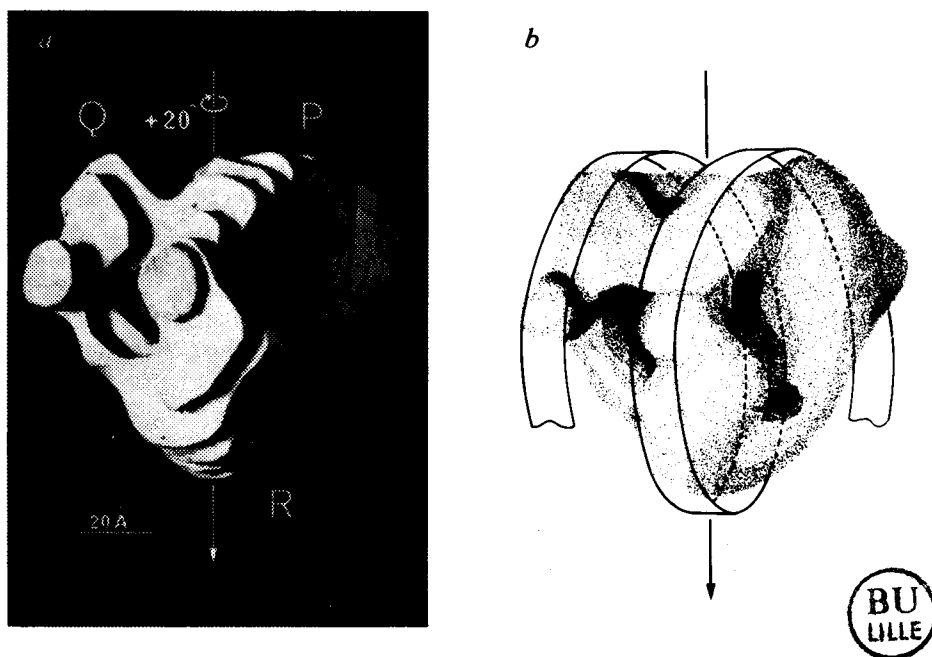
phosphates placés à la lisière du grand sillon du DNA. L'autre côté de la double hélice se trouve donc exposé, accessible et se retrouve tourné vers l'extérieur du complexe lorsque le DNA s'enroule avec les histones pour former la "core particle". 50 p.100 des groupes phosphates sont neutralisés par l'interaction avec les histones ; le DNA demeure ainsi très exposé . CHAO et coll. (1979 et 1980) ont montré que des nucléosomes reconstitués avec le DNA comprenant l'opéron lactose d'*Escherichia coli* n'empêchent pas le répresseur de reconnaître son site avec une haute spécificité sur la séquence du DNA, ce qui confirme bien l'accessibilité du DNA.

- Les résultats obtenus par les techniques de pontage confirment le rôle préférentiel du complexe $(H3-H4)_2$ car ces deux histones occupent 70 nucléotides sur chaque brin du DNA dans la zone médiane, ainsi que quelques nucléotides aux extrémités.

Le modèle de KLUG et coll.(1980) : l'apport décisif de la diffraction des rayons X

La synthèse des résultats obtenus par MIRZABEKOV d'une part et les renseignements fournis par les diagrammes de diffraction des rayons X obtenus sur des cristaux de "core particle" (FINCH et coll., 1981) aboutit au modèle présenté dans la figure 4. La forme cylindrique aplatie de la "core particle" s'est affinée. La "core particle" a une forme de coin ou plus exactement la forme d'un coeur dont les histones dessinent à sa surface un rail protéique, rampe hélicoïdale chargée sur laquelle vient s'enrouler le DNA.

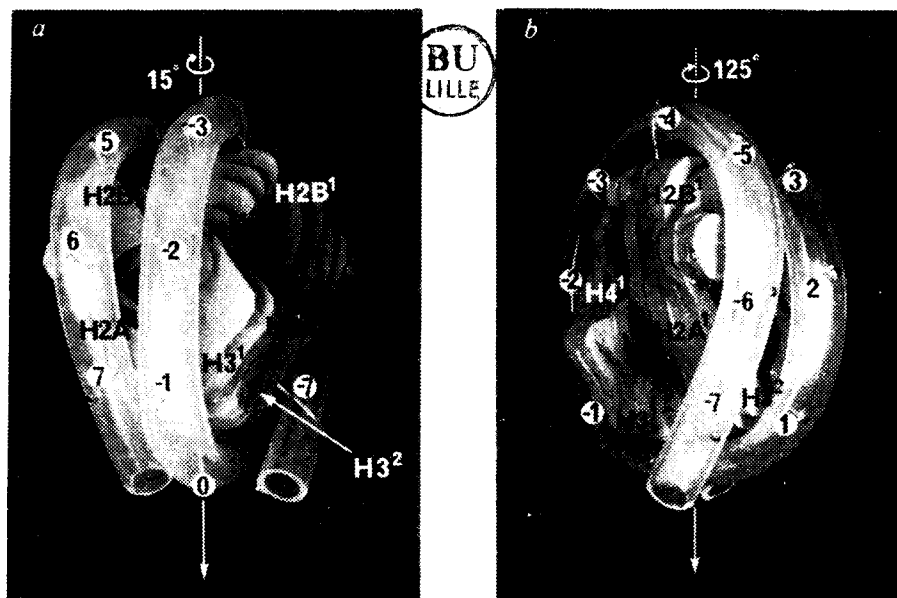
FIG.4-A



- a FORME GENERALE DE L'OCTAMERE D'HISTONES DANS LA "CORE PARTICLE"
- b MATERIALISATION DE LA POSITION DE LA DOUBLE HELICE DE DNA AUTOUR DE CETTE STRUCTURE.

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

FIG.4-B



MODELE MONTRANT LA SITUATION DE CHACUNE DES HISTONES DE L'OCTAMERE PAR RAPPORT A LA DOUBLE HELICE DE DNA

Les chiffres indiqués sur le DNA correspondent aux positions des sites d'hydrolyse par la DNase I.

d'après KLUG et coll. (1980)

I - 1-1-3 La structure nucléosomique : "core particle" +
histone H1

Où est l'histone H1 par rapport à la "core particle" ?

Le nucléosome est défini comme l'enroulement de 2 tours de DNA autour d'un octamère d'histones avec une molécule d'histone H1 placée en position externe dans cette structure. Il est permis de penser que l'histone H1 doit rester accessible dans la chromatine et cela pour deux raisons majeures :

- la sensibilité particulière de cette protéine à l'action des protéases (OUDET et coll., 1974 ; WEINTRAUB et VAN LENTE, 1974).

- l'histone H1 peut être extraite de la chromatine à une concentration saline faible (WILHELM et CHAMPAGNE, 1969).

La figure 5 montre les résultats des techniques de pontages histones-DNA pratiquées par MIRZABEKOV et coll. (1981) sur le nucléosome.

Ces travaux montrent que les sites d'interactions les plus nets entre l'histone H1 et le DNA sont situés aux extrémités 3' et 5' de la double hélice de DNA de 175 pb, tandis que des sites d'interactions plus faibles sont observés dans les zones de DNA sans histone, cela suggère que l'histone H1 est à l'extérieur de la "core particle" et en dehors des 146 pb qui sont en interaction avec l'octamère.

L'histone H1 peut être chimiquement pontée avec toutes les histones de la "core particle", toutefois si on utilise un réactif de pontage de longueur nulle on obtient une liaison de la zone 74-106 de H1 (zone globulaire) à la zone 58-129 de H2A (BOULIKAS et coll., 1980), illustrant la proximité immédiate de ces deux protéines et plaçant l'histone H1 de l'autre côté de H2A par rapport au DNA, au point d'entrée et de sortie de la double hélice nucléotidique. La figure 6 schématise globalement la position de l'histone H1 sur le DNA nucléosomique.

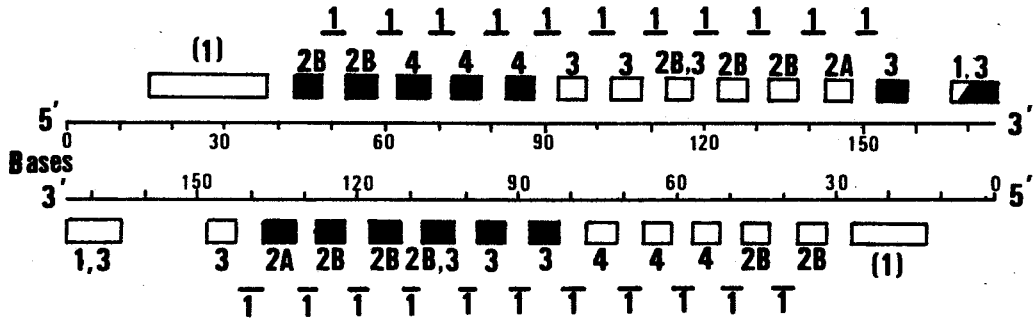


FIGURE 5 MODELE DETAILLE MONTRANT L'ARRANGEMENT DES HISTONES LE LONG DES DEUX BRINS DE DNA DE 175 PAIRES DE BASES DU NUCLEOSOME.

selon MIRZABEKOV (1981)

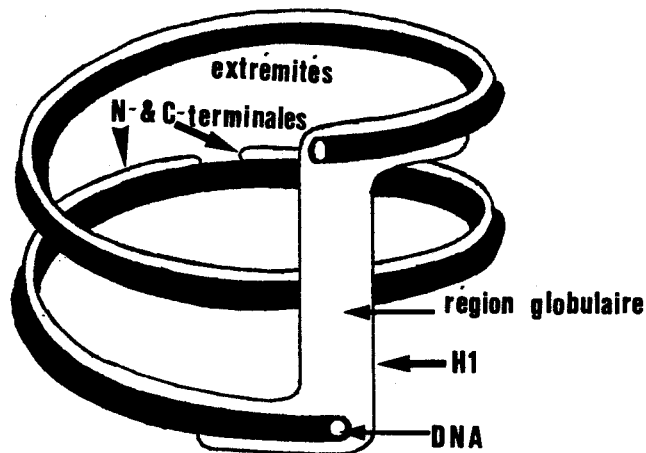


FIGURE 6 MODELE MONTRANT L'INTERACTION DE L'HISTONE H1 AVEC LE DNA DU NUCLEOSOME.

La région globulaire centrale de l'histone H1 est liée aux deux extrémités du DNA tandis que les régions N- et C-terminales non structurées sont liées au reste du DNA.

d'après BELYAVSKY et coll. (1980)

Caractéristiques structurales générales des histones H1

Les histones H1 et apparentées (H1°, H5, HT) présentent trois domaines structuraux caractéristiques (Figure 2) (VON HOLT et coll., 1979)

- un domaine N-terminal basique et peu structuré
- un domaine central hydrophobe de structure globulaire renfermant toute l'organisation structurale de la molécule
- un domaine très basique C-terminal dépourvu de toute structure

Les molécules d'histone H1 illustrent par leur dissymétrie de répartition de leurs acides aminés le concept de "protéine flexible" tel que le définit E.M. BRADBURY (1983).

L'histone H1 possède à la fois une zone globulaire, accessible en tant que telle à une étude biophysique conformationnelle, mais aussi des zones N- et C-terminales qui n'acquièrent leur conformation définitive qu'en interaction avec le DNA. Ce type de protéines du point de vue de leur conformation se situe à mi-chemin entre les protéines purement globulaires (enzymes) et les protéines très étalées dont le rôle est purement structural (scléroprotéines).

Positionnement de l'histone H1 par rapport au DNA

ALLAN et coll. (1980) ont montré que le domaine central d'une histone H1 a la forme d'une sphère de 29 Å de diamètre et vient se placer à l'extérieur de la "core particle" sur les deux brins de DNA entrant et sortant (Figure 7), cette position lui permettant de verrouiller la structure, le nombre de tours de DNA ainsi compacté passe de 1,7 à 2. Ainsi est défini le chromatosome : 168 pb/2 tours de DNA/octamère d'histones + H1. Ce nucléosome minimum étant la structure la plus universellement répandue dans les chromatines d'Eucaryotes.

Les extrémités basiques N- et C-terminales des molécules d'histone H1 sont plaquées sur les brins d'entrée et de sortie de la double hélice de DNA comme le montre la figure 6.

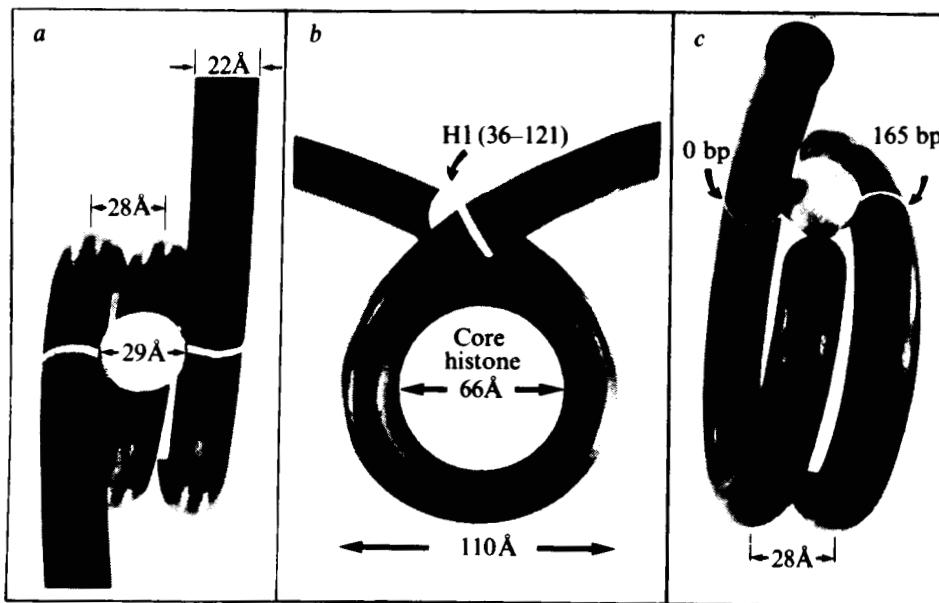


FIGURE 7 LOCALISATION DU DOMAINE GLOBULAIRE DE L'HISTONE H1
DANS LA STRUCTURE NUCLEOSOMIQUE

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

Nature 288, 675-679.

I - 1-2 LA STRUCTURE POLYNUCLEOSOMIQUE OU SUPERSTRUCTURE DE LA CHROMATINE

Pour mettre en évidence la sous-unité répétitive de la chromatine, OUDET et coll.(1974) avaient dû soumettre la chromatine à une légère "trypsination" pour enlever l'histone H1. C'est en effet l'histone H1 qui assure une compaction d'un ordre supérieur des nucléosomes sous la forme d'un solénoïde de 34 nm de diamètre avec un pas de 10 à 16 nm comprenant 6 à 7 nucléosomes par tour (SUAU et coll.,1979). Outre la zone globulaire de l'histone H1, les extrémités basiques des histones de la "core particle" sont impliquées dans le maintien de cette structure en forme de solénoïde (ALLAN et coll.,1982).

Ce solénoïde se développe selon 2 modalités différentes:

- des "super beads" (RENZ et coll.,1977) de 6 à 8 nucléosomes de 20 à 30 nm de diamètre arrangés le long de la fibre de DNA régulièrement espacés de 20 à 30 nm (NICOLA et coll., 1978 ; STRÄTLING et coll.,1978).

- un solénoïde continu ou modèle en superhélice (FINCH et KLUG,1976) présenté dans la figure 8 (THOMA et coll.,1979).

Le modèle de THOMA et coll.(1979) a le mérite de rendre compte des différentes structures observées lors de la compaction progressive des nucléosomes en fonction d'une force ionique croissante jusqu'à aboutir à la fibre de 34 nm.

Le modèle de la superhélice de 6 à 8 nucléosomes par tour est le niveau de compaction maximum actuellement bien étudié. Il relie bien les différents résultats obtenus à partir d'investigations diverses et apparaît solidement admis.

Il nous faut maintenant examiner l'influence des différents types d'histones H1 dans cette compaction de la chromatine à travers deux phénomènes que l'on peut mettre en parallèle : la maturation de l'érythrocyte nucléé de Poulet et la spermatogénèse chez les invertébrés marins.

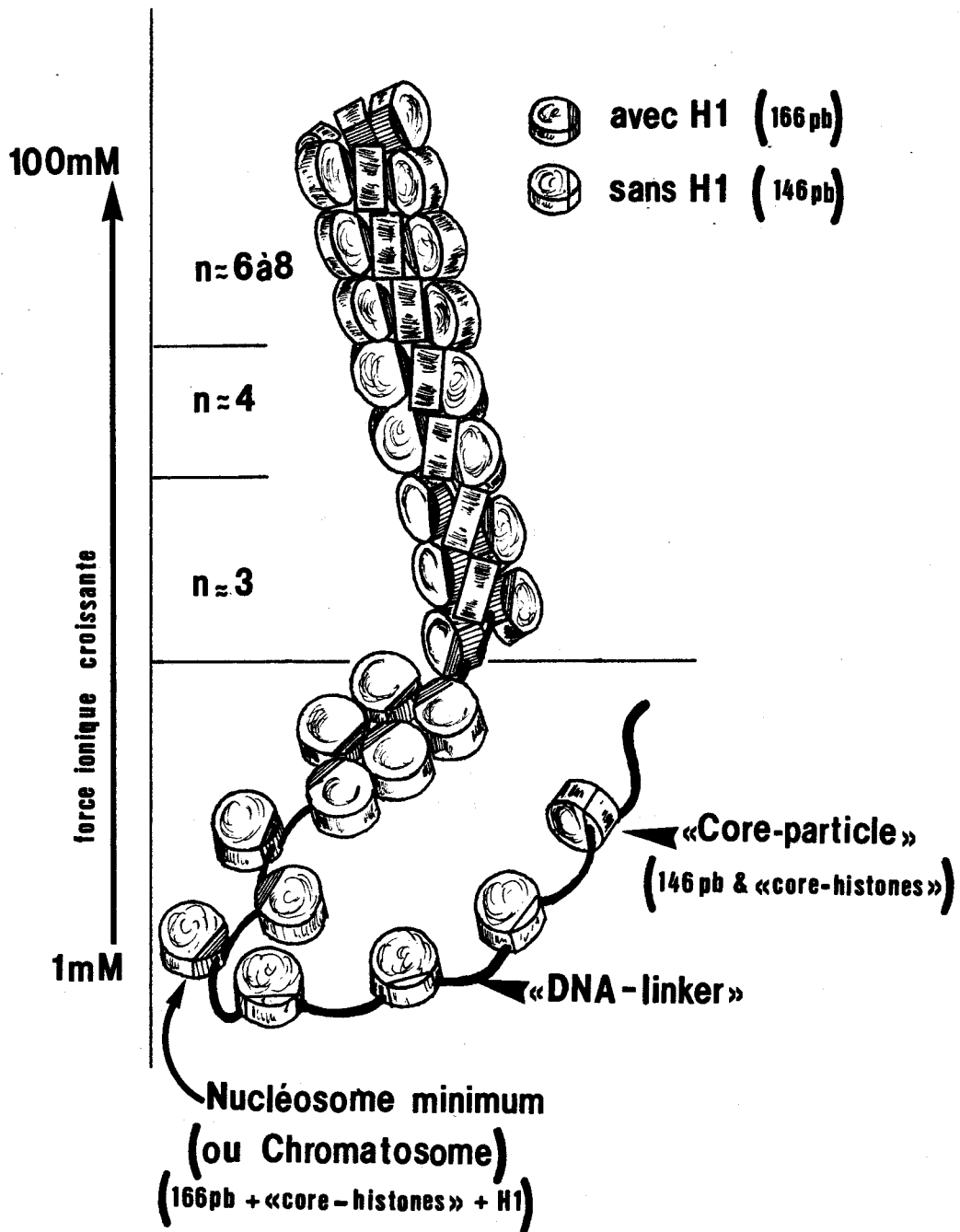


FIGURE 8 MODELE DYNAMIQUE DU SOLENOÏDE DE 34 nm DE DIAMETRE
selon THOMA et coll. (1979) J.Cell.Biol.83,403-407.

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

I - 2 CHROMATINE CONDENSÉE ET HISTONES H1 SPÉCIFIQUES

Les histones H1 présentent une spécificité tissulaire et d'espèce. VON HOLT et coll. (1979) et COLE (1984) ont montré que ces molécules sont présentes sous la forme de 6 variants distincts dans la même chromatine. Les proportions de ces iso-H1 varient selon le déroulement des phénomènes de différenciation (développement embryonnaire, induction hormonale, spermatogénèse, stade final de différenciation). Pour COLE (1984) ces iso-histones H1 présenteraient des aptitudes différentes pour assurer la compaction du DNA.

Certaines cellules spécialisées comme l'érythrocyte nucléé des poissons, amphibiens, reptiles et oiseaux renferme une histone H1 spécifique, l'histone H5* (NEELIN et coll., 1964; HNILICA et coll., 1964) qui apparaît au cours de la maturation érythrocytaire alors que la chromatine devient inactive (HNILICA, 1964). Du point de vue structural, l'histone H5 diffère essentiellement de l'histone H1 par un enrichissement très marqué en résidus d'arginine dans la zone C-terminale (BRIAND et coll., 1980). Cette caractéristique structurale est importante si l'on considère que l'arginine est susceptible de provoquer une condensation plus importante du DNA (VAN HELDEN, 1982) que ne peut le faire la lysine dont le groupe ϵ -aminé ne peut neutraliser qu'un phosphate. Cette remarque peut être étendue aux histones H1 isolées du sperme des invertébrés marins dont la richesse en arginine est supérieure à celle des histones somatiques homologues. En dehors d'une liaison électrostatique avec le DNA, l'arginine peut aussi se lier avec 5 accepteurs de liaison hydrogène et ceci indépendamment du pH (HELENE et LANCELOT, 1982). De plus une interaction de l'arginine avec l'azote 7 de la guanine a été mise en évidence dans le grand sillon du DNA (MIRZABEKOV, 1980) ce qui suggère une possibilité

* Chez les mammifères, seuls les camélidés possèdent des érythrocytes nucléés (SOULIER, 1983).

de reconnaissance des zones riches en GC du DNA par des variants d'histones H1 dont la structure comporte plus d'arginine.... mais cela reste à démontrer.

Un variant particulier d'histone H1, l'histone H1° a été isolé des cellules de mammifères (PANYIM et CHALKLEY, 1969). L'accumulation de ce variant H1° dans la chromatine a pu être corrélée à une inhibition de la prolifération cellulaire (PANYIM et CHALKLEY, 1969 ; PEHRSON et COLE, 1980). Cette protéine apparaîtrait à la fin d'un processus de différenciation cellulaire (GJERSET et coll., 1982). La région globulaire des histones H1° présente 70 p.100 d'homologie avec la région globulaire de l'histone H5 (SMITH et coll., 1980; PEHRSON et coll., 1981). Par ailleurs une parenté immunologique a été mise en évidence par MURA et STOLLAR (1981) entre l'histone H5 et une histone H1° extraite du foie de Souris. Cette analogie a enfin été confirmée par des études de RMN menées sur H1° (CARY et coll., 1981).

Les zones globulaires de ces différents variants d'histones H1 regroupent les homologies entre ces protéines : ce domaine de 71 résidus pour l'histone H1 de thymus de Veau, 72 résidus pour H5 et 75 résidus pour l'histone H1 de sperme d'Oursin a un caractère très hydrophobe et pourrait permettre une interaction avec l'histone H2A de la "core particle" (BOULIKAS et coll., 1980). Sa dimension de 29 nm (largeur de la double hélice de DNA) incite à penser que toutes ces molécules ont le même site de fixation sur le nucléosome (ALLAN et coll., 1980) ce qu'illustre le schéma de la figure 9 (BRADBURY, 1983).

En conclusion, nous pouvons dire qu'un nouveau concept émerge des travaux réalisés sur des variants d'histone H1 caractérisés par un taux plus élevé d'arginine. Il apparaît bien que ces molécules sont impliquées dans des phénomènes de maturation cellulaire que ce soit l'érythrocyte nucléé ou le spermatozoïde. Leur rôle semble lié à une inhibition de la réplication du DNA et aussi de la transcription pour H5 et les H1 du

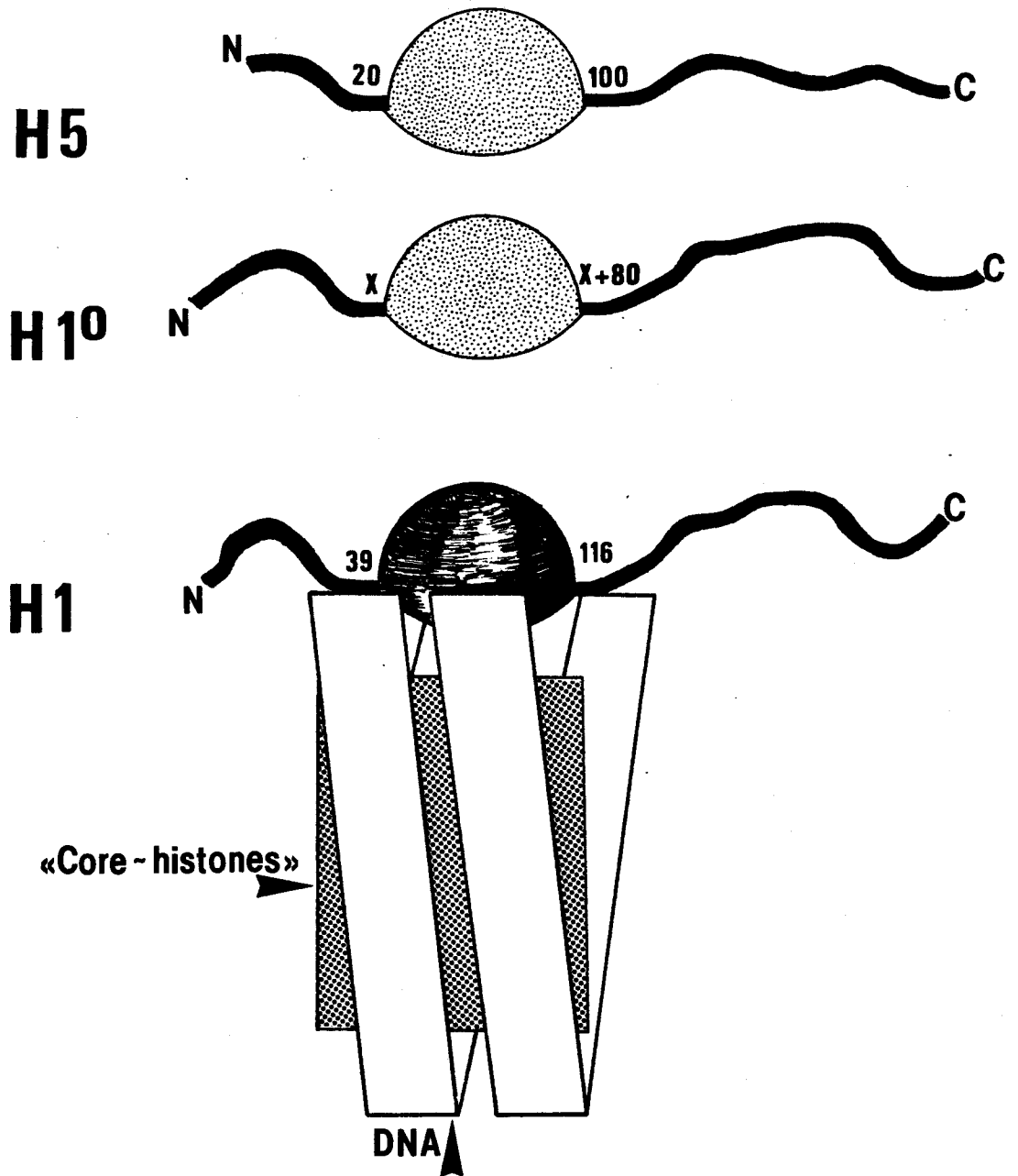


FIGURE 9 MODELE MONTRANT LA LIAISON DE L'HISTONE H1 DANS LE NUCLEOSOME

Les similitudes des domaines globulaires des variants d'histones H1 sont soulignées.

D'après CARY et coll. (1981)

sperme. En ce qui concerne H1°, la transcription demeure possible (SMITH et JOHNS, 1980) bien que H1° condense plus le DNA que ne le fait l'histone H1.

SMITH et coll. (1984) ont réalisé une étude sur la répartition des histones H1° et H5 dans différentes espèces animales et végétales. L'histone H1° est présente chez tous les mammifères étudiés (excepté au niveau du spermatoocyte) à des concentrations variables. Par contre elle est absente chez la crevette *Artemia salina*, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dans le germe de blé (tissu de type embryonnaire). D'autre part ces auteurs ont montré qu'une histone H1 isolée du testicule de Rat n'a pas d'homologie avec l'histone H1°, il s'agirait d'une autre famille d'histone H1 dont la spécificité est tissulaire.

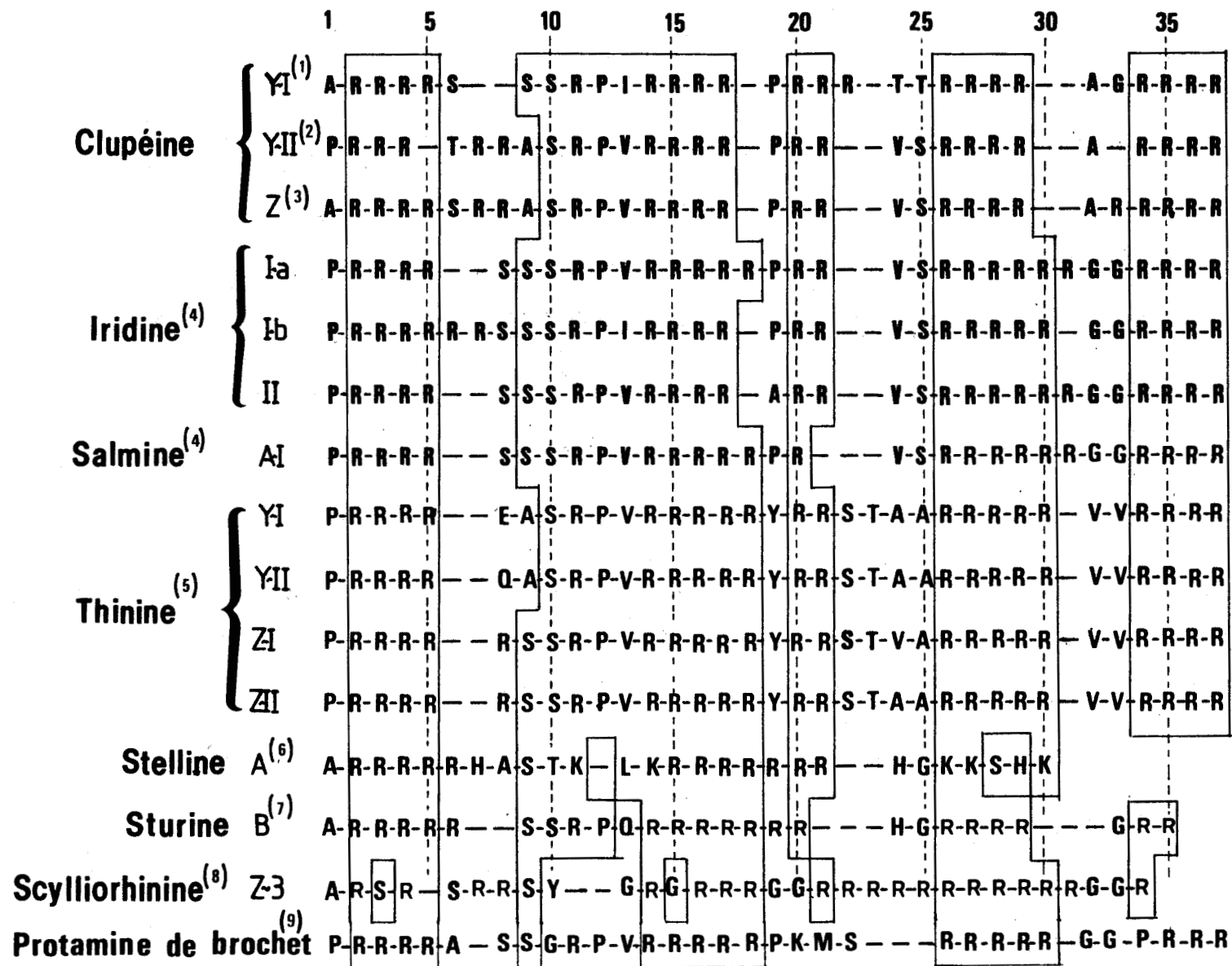
I - 3 ORGANISATION DE LA CHROMATINE DES SPERMATOZOÏDES : REMPLACEMENT DES HISTONES PAR LES PROTAMINES

I - 3-1 CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES PROTAMINES

La chromatine du spermatozoïde de poisson ou de mammifère renferme en général une ou plusieurs protamines associées au DNA.

Les protamines sont généralement très riches en arginine qui représente plus de 50 p.100 des acides aminés constitutifs de ces polypeptides, leur taille est comprise entre 30 et 50 résidus d'acides aminés, cependant chez les mollusques SUBIRANA et coll. (1973) ont, semble-t-il, isolé des protamines de 300 résidus d'acides aminés.

La figure 10 montre la plupart des séquences connues des protamines de poisson. Parmi les mammifères, les seules espèces chez lesquelles la structure de la protamine a été complètement déterminées sont le Taureau, le Verrat et le Bélier (Figure 11).



1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50

Bélier (1) A-R-Y-R-C C-L T-H-S-R-S R-C R-R-R-R-R-R-R-C R-R-R-R-R-R-F-G-R-R-R-R-R-V-C-C-R-R-Y-T-V-V-R-C-T-R-Q

Taureau (2) A-R-Y-R-C C-L T-H-S-G-S R-C R-R-R-R-R-R-R-C R-R-R-R-R-R-F-G-R-R-R-R-R-V-C - -Y-T-V-I-R-C-T-R-Q

Verrat (3) A-R-Y-R-C C-R S-H-S-R-S R - R-C R-P-R-R-R-R-R-R-R-C-C-R-P-R-R-R-R-R-A-V-C-C-R-R-Y-T-V-I-R-C-R-R-C

Etalon (4) A-R-Y-R-C C-R S-Q-S-Q-S R-C R-R-R-R-R-R-R-C R-R-R-R-R-R-S-V - - -R-R-C-R-R-R

Rat (5) A-R-Y-R-C C-R S-K-S-R-S R-C-R - - -T-F-?-?-K-R-Y-R-Y

Homme (6) A-R-Y-R-?-A-R S-Q-S-R-S - - -M-Y-H-R-R-R-C

Dans ces séquences, le taux d'arginine oscille entre 50 et 70 p.100. Les autres acides aminés sont faiblement représentés : il n'y a aucun acide aminé dicarboxylique et peu d'acides aminés hydrophobes.

La plupart des séquences de protamines de poisson répondent au schéma général de répétition de structure suivant : Acide aminé hydrophobe - (Acide aminé basique)_n avec $n \geq 3$. Ce schéma a conduit BLACK et DIXON (1967) à poser l'hypothèse de formation de la clupéine Z à partir d'un pentapeptide Ala-(Arg)₄ par duplications successives d'un gène ancestral (Fig.12). Les protamines de mammifères renferment de la cystéine (Fig.11), contrairement aux protamines de poisson qui en sont généralement dépourvues.

Une exception doit être signalée à propos de la Roussette (Sélaciens) dont le spermatozoïde mûr renferme quatre protamines dont trois contiennent de la cystéine. L'extraction de ces molécules exige au préalable la réduction des ponts disulfures et l'alkylation des groupes thiols qui stabilisent leur interaction avec le DNA. Les protamines montrent une légère dissymétrie de répartition des acides aminés basiques (zone centrale) et des acides aminés hydroxylés (région N-terminale).

Les acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine) sont phosphorylés, la tyrosine peut être sulfatée, ces modifications prennent toute leur importance dans les interactions avec le DNA.

I - 3-2 INTERACTIONS DNA-PROTAMINES

I - 3-2-1 Chromatine de spermatozoïdes ne renfermant que des protamines

Dans ce type de chromatine que l'on rencontre chez les mammifères et les poissons, il n'existe pas de structure rappelant le nucléosome de chromatine somatique. L'étude des interactions DNA-protamine a été effectuée par des méthodes

FIGURE 12 FORMATION DE LA CLUPÉINE Z À PARTIR D'UN PENTAPEPTIDE ALA-(ARG)₄ PAR DUPLICATIONS SUCCESSIVES D'UN GÈNE ANCESTRAL D'APRÈS BLACK ET DIXON (1967)

ÉTAPE	SÉQUENCE	NOMBRE DE RÉSIDUS
PEPTIDE ANCESTRAL	A-R ₄	5
DUPLICATION	A-R ₄ -A-R ₄	10
DUPLICATION PARTIELLE	A-R ₄ -A-R ₂ -A-R ₄ -A-R ₄	18
INSERTION DE A PAR DUPLICATION PARTIELLE	A-R ₄ -A-R ₂ -A-A-R ₄ -A-R ₄	19
CHANGEMENT DE BASE	A-R ₄ -A-R ₂ -A-S-R ₄ -A-R ₄	19
DUPLICATION PARTIELLE	A-R ₄ -A-R ₂ -A-S-R ₂ -A-R ₄ -A-R ₂ -A-S-R ₄ -A-R ₄	31
CHANGEMENT DE BASE (1 SEULE BASE)	A-R ₄ -S-R ₂ -A-S-R-P-V-R ₄ -P-R ₂ -V-S-R ₄ -A-R ₄	31

ALA → SER
GCX → UCX

ALA → VAL
GCX → GUX

ALA → PRO
GGX → CCX

ARG → PRO
CGX → CCX

physiques telles que spectroscopies UV et IR, dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X et résonance magnétique nucléaire. Ces différentes approches méthodologiques (Travaux de LIQUIER et coll., 1975 ; HERSKOVITS et BRAHMS, 1976 ; SUAU et SUBIRANA, 1977 ; WARRANT et KIM, 1978 ; BONORA et coll., 1979 ; TONIOLO et coll., 1979 ; COZZONE et coll., 1980) ont permis de dégager les caractéristiques suivantes du complexe DNA-protamines :

- Le DNA est stabilisé sous forme β dans le complexe DNA-protamine.

- La chaîne polypeptidique des protamines est étendue et située dans le petit sillon du DNA.

ROD BALHORN (1982) a proposé un modèle remarquable pour expliquer l'interaction DNA-protamines (Figures 13 et 14) qui serait valable en particulier dans le cas des protamines de mammifères. Ce modèle est tout à fait compatible avec les caractéristiques suivantes de la chromatine du spermatozoïde :

- La présence de résidus de cystéine dans les protamines de mammifères permet l'accrochage des chaînes protéiques entre elles, alors que les protamines viennent de se fixer sur le DNA par leur zone polyarginyle centrale, au moment où le spermatozoïde quitte le testicule et traverse l'épididyme, dans la période finale de sa maturation (CALVIN et coll., 1971 ; MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1975 ; SAOWAROS et PANYIM, 1979).

- La structure compacte globale obtenue est compatible avec le volume du noyau du spermatozoïde, compte tenu des masses respectives du DNA et des protamines présentes. Le calcul du volume du complexe DNA-protamines suggère même qu'une partie de la chaîne protéique doit se trouver enfouie à l'intérieur de l'un des sillons du DNA afin que le volume total de la chromatine puisse être légèrement inférieur à celui du noyau (WYROBEK et coll., 1976).

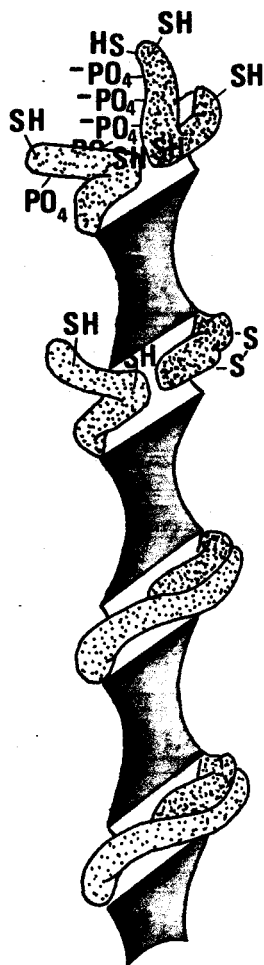


FIGURE 13 SCHEMA MONTRANT LA FORMATION DE PONTS DISULFURES DANS LES PROTAMINES DE MAMMIFERES

3 étapes:- Liaison protamines phosphorylées sur le DNA au niveau des zones basiques centrales des protamines

- Déphosphorylation des résidus de sérine et thréonine (situés dans les régions N-terminales)

- Formation de ponts disulfures et verrouillage de la structure

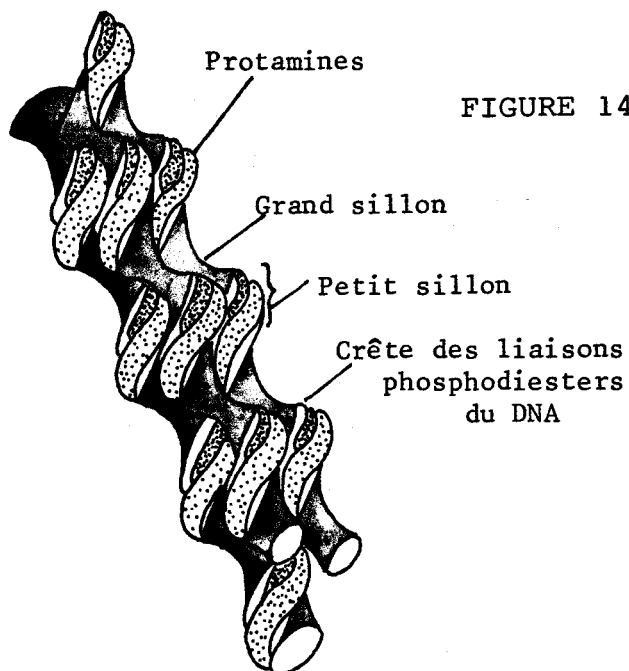


FIGURE 14 EMPILEMENT DES FIBRES DE DNA-PROTAMINES DANS LA CHROMATINE

selon R. BALHORN (1982)

- Par ailleurs POGANY et coll. (1981) ainsi que YU et LI (1973) ont montré que la charge globale du complexe DNA-protamines est nulle et donc que tous les groupes phosphates du DNA sont neutralisés par les charges positives des résidus basiques. Le modèle proposé par BALHORN (1982) tient compte de la zone centrale polyarginyle dans la première étape de l'interaction DNA-protamine; dans un deuxième temps les ponts disulfures stabilisent le complexe et la protamine se logerait bien dans le petit sillon du DNA.

On constate cependant une différence énorme entre le modèle nucléosomique de la condensation du DNA dans les cellules somatiques et le modèle de BALHORN compatible néanmoins avec toutes les investigations menées sur le complexe DNA-protamine. La corrélation de ce modèle à l'observation de la nucléoprotamine *in vivo* ou reconstituée en microscopie électronique n'est toutefois pas évidente, car lorsque les protamines ont complètement remplacé les histones dans le noyau du spermatozoïde, différentes structures sont observées :

- Chez les mammifères la chromatine apparaît formée d'agrégats de billes et d'agrégats lamelliformes (EVENSON et coll., 1978 ; DELGADO et coll., 1980 ; WAGNER et YUN, 1981).

- D'autres auteurs n'ont vu aucune de ces structures excepté dans les premiers stades de la spermatogénèse alors que les histones sont présentes (KIERSZENBAUM et TRES, 1975, 1978 ; CECH et coll., 1977 ; LOIR et COURTENS, 1979 ; MC MASTER-KAYE et KAYE, 1980).

- Enfin la nucléoprotamine reconstituée peut acquérir une structure globulaire (BAZETT-JONES et OTTENSMEYER, 1979 ; CID et ARELLANO, 1982).

Chez la Roussette GUSSE et CHEVAILLIER (1980) ont décrit la nucléoprotamine formée d'unités répétitives comprenant 123 pb de DNA et 4 protamines (CHEVAILLIER, 1982). La digestion de cette sous-unité à la DNase I indique une perte de l'accessibilité du DNA, dans une telle structure les sites situés à intervalles de 10 paires de bases sont donc protégés (comme ils le sont dans le modèle de BALHORN).

I - 3-2-2 Chromatine de spermatozoïdes renfermant à la fois
des histones et des protamines

Chez les Echinodermes la chromatine du spermatozoïde mûr renferme des histones de type somatique et des histones spécifiques de type H1 et H2B. Ces histones spécifiques sont plus longues et plus riches en arginine que leurs homologues isolées de tissus somatiques (STRICKLAND et coll., 1978). Ceci est à corrélérer avec une longueur de DNA nucléosomique qui est comprise entre 240 et 275 pb (CORNUDELLA et ROCHA, 1979). Par ailleurs dans le spermatozoïde du mollusque bivalve *Ensis minor* (Couteau) (GIANCOTTI et coll., 1984) et dans celui du poisson rouge *Cerassius auratus* (MUÑOZ-GUERRA et coll., 1982) la longueur du DNA nucléosomique (environ 200 pb) est comparable à celle que l'on observe dans la chromatine des vertébrés supérieurs .

Chez les Crustacés (SELLOS et LE GAL, 1981) et les Echinodermes (PALAU et coll., 1969 ; VANHOUTTE-DURAND et coll., 1977) la chromatine du spermatozoïde ne renferme que des histones. Chez les Mollusques, tous les cas de figure peuvent se présenter dans la chromatine de sperme mûr : histones seules, protamines seules et histones + protamines (SUBIRANA et coll., 1973 ; COLOM et SUBIRANA, 1979 ; SUBIRANA, 1975).

I - 3-3 PHENOMENE DE MATURATION DU SPERMATOZOÏDE. MISE EN
EVIDENCE DE PROTEINES INTERMEDIAIRES ENTRE LES HIS-
TONES ET LES PROTAMINES

Les figures 15 et 16 résument l'essentiel des événements moléculaires de la spermatogénèse de la Roussette (Fig.15) et du Bélier (Fig.16).

- Chez la Roussette le remplacement des histones par les protamines se déroule en 3 étapes (GUSSE et CHEVAILLIER, 1981):

. Au début du stade d'élongation des spermatides deux protéines spécifiques S1 et S2 apparaissent alors que les histones disparaissent progressivement.


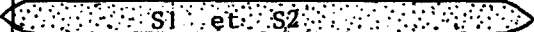
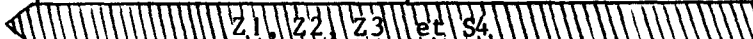
	SPERMATIDES (Zone B du testicule)			SPERMATOZOÏDES (Zone C du testicule et épидидyme)	
	Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4	Stade 5
Organisation des noyaux	Contenu hétérogène nucléole, particules nucléaires	Contenu homogène	Début de l'élongation	Milieu de l'élongation	Maximum de l'élongation Noyaux biréfringents
Chromatine	Fractions condensées et dispersées	Dispersée	Orientation des fibres le long du grand axe du noyau	Agrégation des fibres de chromatine en un réseau pseudolamellaire	Homogène - fortement condensée - torsadée
Structures répétitives	192 pb "Aspect "collier de perles"		165 pb	123 pb (?)	
Accessibilité DNase	-----				
Histones					
Protéines intermédiaires	 S1 et S2				
Protamines	 Z1, Z2, Z3 et S4				
				Réduites, phosphorylées (SH) (Solubles ATCA)	- Déphosphorylées - Oxydées (S-S) (Insolubles ATCA sauf Z3)

FIGURE 15 SPERMIOGENESE DE LA ROUSSETTE d'après M.GUSSE et Ph.CHEVAILLIER (1981)

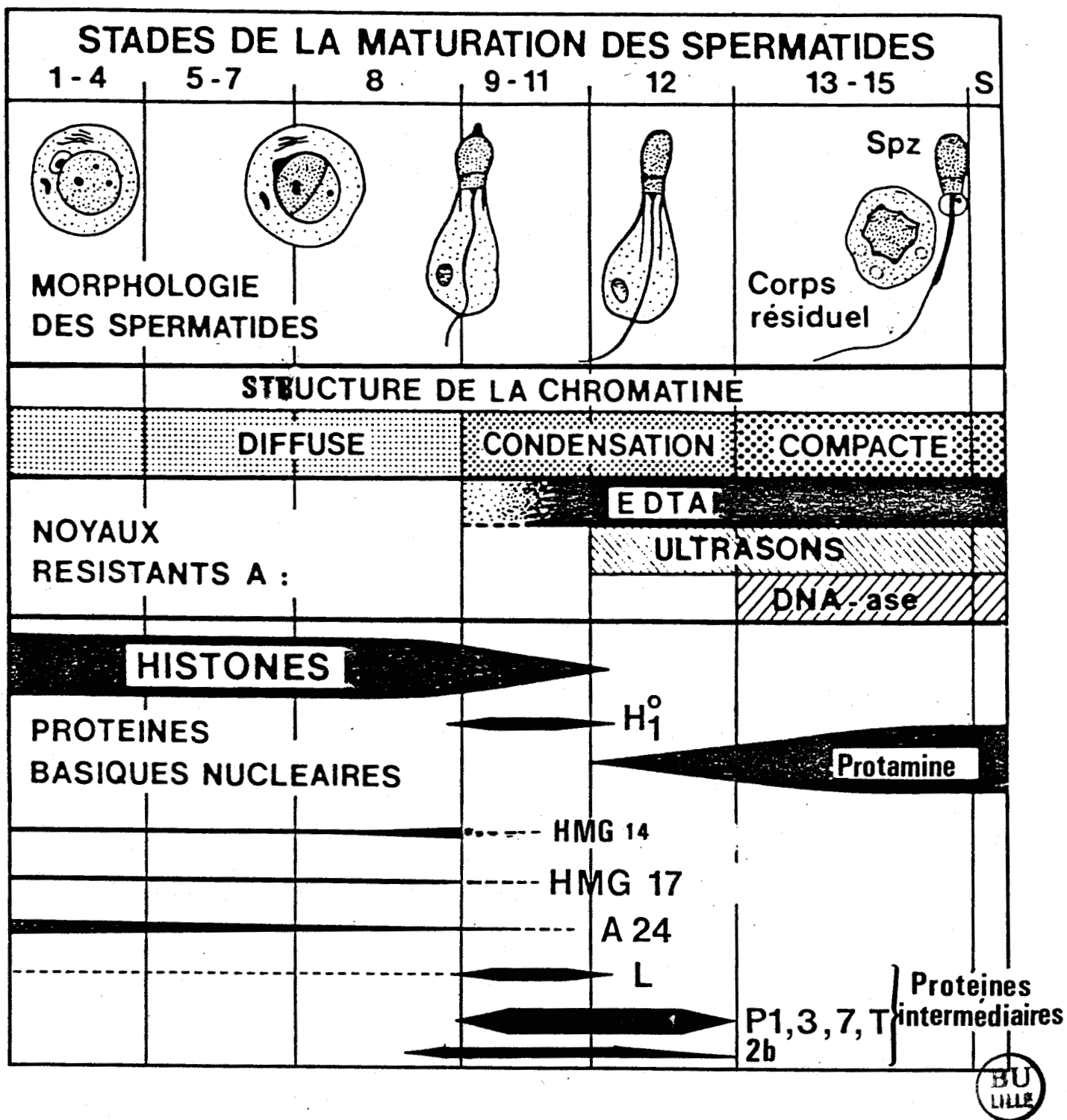


FIGURE 16 RESUME DES EVENEMENTS CONCERNANT LE NOYAU AU COURS DE LA SPERMIOGENESE CHEZ LE BELIER.

d'après M.LOIR



. Au stade final de la formation du noyau, les quatre protamines de la Roussette (Z1, Z2, Z3 et S4) apparaissent tandis que S1 et S2 disparaissent.

. Dans le spermatozoïde mûr S1 et S2 sont éliminées et les quatre protamines subsistent.

Du point de vue structural, cette transition dans les protéines est accompagnée d'une perte de la structure nucléosomique tandis qu'apparaissent des rangées parallèles bien ordonnées de complexes DNA-protamines. Mais les modalités structurales à la base de cet arrangement particulier ne sont pas connues.

- Chez le Bélier (Fig.16) une seule protamine apparaît en fin de maturation du gamète mâle. Les protéines intermédiaires (4 protéines) ne sont pas encore bien connues. On notera l'apparition d'une histone de type H1° au cours de la condensation de la chromatine et sa disparition dès la compaction du matériel génétique.

Dans les deux exemples choisis, la maturation du spermatozoïde est complexe et vise à une condensation totale du DNA (précipitation). Chez les animaux moins évolués (Invertébrés marins par exemple) le processus n'est jamais poussé aussi loin et des structures de type nucléosomique sont encore présentes dans la chromatine. Lorsque les histones sont présentes avec des protamines (comme chez *Platynereis dumerelii*) il nous restera à comprendre comment ces molécules sont impliquées simultanément dans l'organisation du DNA.

Il serait fructueux de relier cet inventaire des protéines impliquées dans la condensation de la chromatine du spermatozoïde avec les caractéristiques de la situation évolutive de l'animal sur l'arbre phylogénétique. Lorsque l'animal est primitif et situé à l'origine d'un *phylum* (formes simples, différenciations relativement peu poussées comme chez

les annélides on trouve à la fois des histones et des protamines. Lorsque l'animal est évolué (formes complexes, différenciations poussées) et situé à la fin d'un *phylum* (mammifères, roussettes, seiches) on ne trouve en général que des protamines pour organiser le DNA du spermatozoïde. Ainsi l'apparition des protamines serait, considérée du point de vue de l'évolution, liée à la différenciation et la spécialisation des formes animales. Toutefois la quantité d'informations dont nous disposons est encore insuffisante pour assurer cette observation.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLFREY, V.G. (1977)
Post-synthetic modifications of histone structure : a mechanism for the control of chromosome structure by the modulation of histone-DNA interaction.
in "Chromatin and Chromosome Structure" Eds LI and Eckhardt, Academic Press, New York p.167-191.
- 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., 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.
- ANDO, T., IWAÏ, K., ISHII, S., AZEGAMI, M. and NAKAHARA, C. (1962)
The chemical structure of one component of clupeine.
Biochim.Biophys.Acta 56, 628-630.
- ANDO, T. and SUZUKI, K. (1966)
The amino acid sequence of the second component of clupeine.
Biochim.Biophys.Acta 121, 427-429.
- ANDO, T. and SUZUKI, K. (1967)
The amino acid sequence of the third component of clupeine.
Biochim.Biophys.Acta 140, 375-376.
- ANDO, T. and WATANABE, S. (1969)
A new method for fractionation of protamines and the amino acid sequence of salmine and three components of iridine.
J.Protein.Research 1, 221-224.
- ANDO, T., YAMASAKI, M. and SUZUKI, M. (1973)
Isolation, characterization, structure and function.
in "Protamines" vol.12 (Kleinzeller A., ed.) Springer-Verlag Berlin pp 1-115.

- BALHORN, R. (1982)
 A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.
J.Cell.Biol. 93, 298-305.
- BAZETT-JONES, D.P. and OTTENSMEYER, F.P. (1979)
 A model for the structure of nucleoprotamine.
J.Ultr.Res. 67, 255-266.
- BELYASKY, A.V., BAVYKIN, S.G., GOGUADZE, E.G. and MIRZABEKOV, A.D. (1980)
 Primary organization of nucleosomes containing all five histones and DNA.
J.Mol.Biol. 139, 519-536.
- BENTLEY, C.A., FINCH, J.T. and LEWIT-BENTLEY, A. (1981)
 Neutron diffraction studies on crystals of nucleosome cores using contrast variation.
J.Mol.Biol. 145, 771-784.
- BLACK, J.A. and DIXON, G.H. (1967)
 Evolution of protamine : a further example of partial gene duplication.
Nature 216, 152-154.
- BONORA, G.M., FERRARA, L., PAOLILLO, L., TONIOLO, C. and TRIVELLONE, E. (1979)
¹³C nuclear magnetic resonance of protamines. The three main components of clupeine.
Eur.J.Biochem. 93, 13-21.
- BORIE-LOY, O. (1976)
 Contribution à la détermination de la structure primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet. (Etude des peptides chymotrypsiques et pepsiques de la protéine).
 Thèse de 3ème cycle, Lille 1976
- 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., MOSS, T., HAYASHI, H., HJELM, P., SUAUI, 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.
- BRADBURY, E.M. (1983)
 Flexibility in chromosomal proteins.
 in "Mobility and Recognition in Cell biology" Eds SUND, VEEGER. Walter de Gruyter and Co. Berlin - New York
 p. 173-193.

- BRADDOCK, G.W., BALDWIN, J.P., BRADBURY, E.M. (1981)
Neutron-scattering studies of the structure of chromatin core particles in solution.
Biopolymers 20, 327-343.
- BRETZEL, G. (1972)
Über Thynin, das Protamine des Thunfisches. Die Sequenz der Komponente YI. XII Mitteilung über die Struktur der Protamine in der Untersuchungsreihe von E. WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1362-1364.
- BRETZEL, G. (1973)
Über Thynin, das Protamine des Thunfisches. Die Aminosäuresequenz von Thynin ZI. XIII Mitteilung über die Struktur der Protamine in der Untersuchungsreihe von E. WALDSCHMIDT-LEITZ und Mitarbeitern.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 312-320.
- BRIAND, G. (1976)
Contribution à la détermination de la structure primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet. (Etude des peptides obtenus par hydrolyse enzymatique [protéase staphylococcique et thermolysine] et par hydrolyse en milieu acide dilué de la protéine).
Thèse de 3ème cycle, Lille 1976
- BRIAND, G., KMIETIK, 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-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence.
FEBS Letters 112, 147-151.
- BRIAND, G. (1981)
Histone H5 d'érythrocyte de Poulet. Sequence complète en acides aminés. Etudes conformationnelles.
Thèse de Doctorat d'Etat, Lille 1981
- CALVIN, H.I. and BEDFORD, J.M. (1971)
Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis.
J. Reprod. Fertil. 13, 65-75 (suppl.).
- CARY, P.D., HINES, M.L., BRADBURY, E.M., SMITH, B.J. and JONES, E.W. (1981)
Comparison with histones H1 and H5.
Eur. J. Biochem. 120, 371-377.
- CECH, T., POTTER, D. and PARDUE, M.L. (1977)
Electron microscopy of DNA cross-linked with trimethylpsoralen : a probe for chromatin structure.
Biochemistry 16, 5313-5321.

- CHAHAL, S.S., MATTEWS, H.R. and BRADBURY, E.M. (1980)
Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function.
Nature 287, 76-79.
- CHAO, M.V., GRALLA, J. and MARTINSON, H.G. (1979)
DNA sequence directs placement of histone cores on restriction fragments during nucleosome formation.
Biochemistry 18, 1068-1074.
- CHAO, M.V., GRALLA, J.D. and MARTINSON, H.G. (1980)
Lac operator nucleosomes I - Repressor binds specifically to operator within the nucleosome core.
Biochemistry 19, 3260-3269.
- CHEVAILLIER, Ph. (1982)
Some aspects of chromatin organization in sperm nuclei.
4th International Congress of Spermatology Scellae, juillet 1982
- CID, H. and ARELLANO, A. (1982)
Secondary structure prediction of protamines.
Int.J.Biol.Macromol. 4, 3-8.
- COELINGH, J.P., MONFOORT, C.H., ROZIJN, T.H., GEVERS-LEUVEN, J.A., SCHIPHOF, R., STEYN-PARVE, E.P., BRAUNITZER, G., SCHRANK, B. and RUHFUS, A. (1972)
The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa.
Biochim.Biophys.Acta 285, 1-14.
- COLE, R.D. (1984)
A minireview of microheterogeneity in H1 histone and its possible significance.
Anal.Biochem. 136, 24-30.
- COLOM, J. and SUBIRANA, J.A. (1979)
Protamines and related proteins from spermatozoa of mollusc. Characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis.
Biochim.Biophys.Acta 581, 217-227.
- CORNUDELLA, L. and ROCHA, E. (1979)
Nucleosomal organization during germ cell development in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*.
Biochemistry 18, 3724-3732.
- COZZONE, P., TONIOLO, C. and JARDETZKY, O. (1980)
NMR study of the main components of clupeine and their possible interaction with nucleic acids.
FEBS Letters 110, 21-24.
- DEBRU, C. (1983)
in "L'Esprit des protéines" Editions HERMANN.

- DELGADO, N.M., HUACUJA, L., MERCHANT, H., REYES, R. and ROSADO, A. (1980)
Arch. Androl. 4, 305-313.
- DIXON, G.H., CANDIDO, E.P.M., HONDA, B.M., LOUIE, A.J., MACLEOD, A.R., SUNG, M.T. (1974)
The biological roles of post-synthetic modifications of basic nuclear proteins.
CIBA Found. Symp.: The structure and function of chromatin
Elsevier, Amsterdam 28, 229-258.
- EDMAN, P. (1950)
Method for determination of the amino acid sequence in peptides.
Acta Chem. Scand. 4, 283
- EICKBUSCH, T.E. and MOUDRIANAKIS, E.M. (1978)
The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.
Biochemistry 23, 4955-4964.
- EVENSON, D.P., WITKEN, S.S., de HARVEN, E. and BENEDICK, A. (1978)
Ultrastructure of partially decondensed human spermatozoal chromatin.
J. Ultrastruc. Res. 63, 178-187.
- FINCH, J.T. and KLUG, A. (1976)
Solenoidal model for superstructure in chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1897-1901.
- FINCH, J.T., BROWN, R.S., RHODES, D., RICHMOND, T., RUSHTON, B., LUTTER, L.C. and KLUG, A. (1981)
X-Ray diffraction study of a new crystal form of the nucleosome core showing higher resolution.
J. Mol. Biol. 145, 751-769.
- GAASTRA, W., LUKKES-HOFSTRA, J. and KOLK, A.H.J. (1978)
Partial covalent structure of two basic chromosomal proteins from human spermatozoa.
Biochem. Genet. 16, 525-529.
- GIANCOTTI, V., RUSSO, E., GASPARINI, M., SERRANO, D., DEL PIERO, D., THORNE, A.W., CARY, P.D. and CRANE-ROBINSON, C. (1983)
Proteins from the sperm of the bivalve mollusc *Ensis Minor*. Co-existence of histones and aprotamine-like protein.
Eur. J. Biochem. 136, 509-516.
- GJERSET, R., GORKA, C., HASTHORPE, S., LAWRENCE, J.J. and ELSSEN, H. (1982)
Developmental and hormonal regulation of protein H1° in rodents.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2333-2337.

- GUSSE, M. and CHEVAILLIER, Ph. (1980)
Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatine.
J.Cell.Biol. 87, 280-284.
- GUSSE, M. and CHEVAILLIER, Ph. (1981)
Microelectrophoretic analysis of basic protein changes during spermiogenesis in the dogfish *Scylliorhinus caniculus* (L).
Exp.Cell.Res. 136, 391-397.
- HELENE, C. and LANCELOT, G. (1982)
Interactions between functional groups in protein-nucleic acid associations.
Prog.Biophys.Mol.Biol. 39, 1-68.
- HERSKOVITS, T.T. and BRAHMS, J. (1976)
Structural investigations on DNA-protamines complexes.
Biopolymers 15, 687-706.
- HEWISH, D.R. and BURGOYNE, L.A. (1973)
Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regulary spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 52, 504-510.
- HNILICA, L.S. (1964)
The specificity of histones in chicken erythrocytes.
Experientia 20, 13-14.
- JACKSON, V., SHIRES, A., CHALKLEY, R. and GRANNER, D.K. (1975)
Studies on highly metabolically active acetylation and phosphorylation of histones.
J.Biol.Chem. 250, 4856-4863.
- KIERSZENBAUM, A.L. and TRES, L.L. (1975)
Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome.
J.Cell.Biol. 65, 258-270.
- KIERSZENBAUM, A.L. and TRES, L.L. (1978)
The packaging unit : a basic structural feature for the condensation of late cricket spermatid nuclei.
J.Cell.Sci. 33, 265-283.
- KISTLER, W.S., KEIM, P.S. and HEINRICKSON, R.L. (1976)
Partial analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa.
Biochim.Biophys.Acta 427, 752-757.
- 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.

- KMIECIK, D. (1976)
Contribution à la détermination de la structure primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet. (Etude des peptides tryptiques de la protéine native et maléylée).
Thèse de 3ème cycle, Lille 1976.
- KORNBERG, R.D. (1974)
Chromatin structure : a repeating unit of histone and DNA chromatin structure is based on a repeating unit of height histone molecule and about 200 DNA base pairs.
Science 184, 868-871.
- LIQUIER, J., PINOT-LAFAIX, M., TAILLANDIER, E. and BRAHMS, J. (1975)
Infrared linear dichroism investigations of deoxyribonucleic acid complexes with poly(L-Arginine) and poly(L-Lysine).
Biochemistry 14, 4191-4197.
- LOIR, M. and COURTENS, J.L. (1979)
Nuclear reorganization in ram spermatids.
J.Ultr.Res. 67, 309-324.
- MAC GHEE, J.D. and FELSENFELD, G. (1980)
Nucleosome structure.
Ann.Rev.Biochem. 49, 1115-1156.
- MC MASTER-KAYE, R. and KAYE, J.S. (1980)
Organization of chromatin during spermiogenesis beaded-fibers, and loss of nucleosomal structure.
Chromosoma (Berl.) 77, 41-46.
- MARTINAGE, A. (1984)
Histones H2A et H2B de gonades d'Etoile de mer. Structure primaire. Phosphorylation des histones libres ou associées au DNA.
Thèse de Doctorat d'Etat, Lille 1984
- MARUSHIGE, Y. and MARUSHIGE, K. (1974)
Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa.
Biochim.Biophys.Acta 340, 498-508.
- MIRZABEKOV, A.D., SCHICK, V.V., BELYAVSKY, A.V. and BAVYKIW, S.G. (1978)
Primary organization of nucleosome core particle of chromatin sequence of histone arrangement along DNA.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 4184-4188.
- MIRZABEKOV, A.D. (1980)
Nucleosomes structure and its dynamic transitions.
Quarterly.Rev.of Biophysics 13, 255-295.
- MIRZABEKOV, A.D. (1981)
Nucleosome structure.
Trends in Biochem.Sci. septembre 1981, p.240-242.

- 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.
- MUÑOZ-GUERRA, S., AZORIN, F., CASAS, M.T., MARCET, X., MARISTANY, M.A., ROCA, J. and SUBIRANA, J.A. (1982)
Structural organization of sperm chromatin from the fish *Carassius auratus*.
Exp.Cell.Res. 137, 47-53.
- MURA, C.V. and STOLLAR, B.D. (1981)
Serological detection of homologies of H1° with H5 and H1 histones.
J.Biol.Chem. 256, 9767-9769.
- NAKANO, M., TOBITA, T. and ANDO, T. (1976)
Studies on a protamine (galline from fowl sperm) III - The total amino-acid sequence of intact galline molecule.
Int.J.Pept.Prot.Res. 8, 565-578.
- NEELIN, J.M., CALLAGHAN, P.X., LAMB, D.C. and MURRAY, K. (1964)
Histones of chicken erythrocyte nuclei.
Can.J.Biochem. 42, 1743-1752.
- NICOLA, N.A., FULMER, A.W., SCHWARTZ, A.M. and FASMAN, G.D. (1978)
High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of histones and histone-histone complexes in aqueous solution.
Biochemistry 17, 1779-1785.
- 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.
- OLINS, A.L. and OLINS, D.E. (1974)
Spheroid chromatin units (v bodies).
Science 183, 330-332.
- 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.
- PALAU, J., RUIZ-CARILLO, A. and SUBIRANA, J.A. (1969)
Histones from sperm of the sea urchin *Arbacia lixula*.
Eur.J.Biochem. 7, 209-213.
- PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969)
High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.
Arch.Biochem.Biophys. 130, 337-346.

- PEHRSON, J.R. and COLE, R.D. (1980)
Histone H1^o accumulates in growth-inhibited cultured cells.
Nature 285, 43-44.
- PEHRSON, J.R. and COLE, R.D. (1981)
Bovine histone H1^o subfractions contain an invariant sequence which matches histone H5 rather than H1.
Biochemistry 20, 2298-2301.
- PRUNELL, A., KORNBERG, R.D., LUTTER, L.C., KLUG, A., LEVITT, M. and CRICK, P.H.C. (1979)
Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin.
Science 204, 855-858.
- 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, 1879-1884.
- SAOWAROS, W. and PANYIM, S. (1979)
The formation of disulfide bonds in human protamines during sperm maturation.
Experientia 35, 191-192.
- SAUTIERE, P., BRIAND, G., GUSSE, M. and CHEVAILLIER, Ph. (1981)
Primary structure of a protamine isolated from the sperm nuclei on the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*.
Eur. J. Biochem. 119, 251-255.
- SAUTIERE, P., BELAÏCHE, D., MARTINAGE, A. and LOIR, M. (1984)
Primary structure of the ram (*Ovis aries*) protamine.
Eur. J. Biochem. (acceptée pour publication)
- SAUTIERE, P. and LOIR, M. (1984)
Complete amino acid sequence of the major basic nuclear protein of stallion spermatozoa.
(Travail en cours)
- SELLOS, D. and LE GAL, Y. (1981)
Changes in basic nuclear proteins during sperm maturation in *Palaemon cerratus* (Crustacea natancia).
Cell. Differentiation 10, 69-77.
- SIMPSON, R.T. (1978)
Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA all the histones.
Biochemistry 17, 5524-5531.
- SMITH, B.J. and JOHNS, E.W. (1980)
Histone H1^o : its location in chromatin.
Nucleic Acids Research 8, 6069-6079.

- SMITH, B.J., WALKER, J.M. and JOHNS, E.W. (1980)
Structural homology between a mammalian H1^o subfraction
and avian erythrocyte specific histone H5.
FEBS Letters 112, 42-44.
- SMITH, B.J., HARRIS, M.R., SIGOURNAY, C.M., MAYES, E.L.V. and
BUSTIN, M. (1984)
Assurey of H1^o and H5-like proteine structure and dis-
tribution in higher and lower eukaryotes.
Eur.J.Biochem. 138, 309-317.
- SOULIER, J.P. (1983)
Le sang, introduction à l'hématologie et à la transfusion.
Edition FLAMMARION.
- SPECKERT, W., KENNEDY, B., DAISLEY, St.L. and DAVIES, P. (1983)
Primary structure of protamine from the northern pike
Esox lucius.
Eur.J.Biochem. 136, 283-289.
- STRÄTLING, W.H., MÜLLER, U. and ZENTGRAF, H. (1978)
The higher order repeat structure of chromatin is built
up of globular particles containing eight nucleosomes.
Exp.Cell.Res. 117, 301-311.
- STRICKLAND, M., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F., VON HOLT, C.,
WITTMANN-LIEBOLD, B. and LEHMANN, E. (1978)
The complete amino acid sequence of histone H2B from
sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*.
Eur.J.Biochem. 89, 443-452.
- SUAU, P. and SUBIRANA, J.A. (1977)
X-ray diffraction studies of nucleoprotamine structure.
J.Mol.Biol. 117, 909-926.
- SUAU, P., KNEALE, G.C., BRADDOCK, G.W., BALDWIN, J.P. and
BRADBURY, E.M. (1977)
A low resolution model for the chromatin core particle
by neutron scattering.
Nucleic Acid Research 4, 3769-3786.
- SUAU, P., BRADBURY, E.M. and BALDWIN, J.P. (1979)
Higher order structures of chromatin in solution.
Eur.J.Biochem. 87, 593-602.
- SUBIRANA, J.A., COZCOLLUELA, C., PALAU, J. and UNZETA, M. (1973)
Protamines and other basic proteins from spermatozoa
of molluscs.
Biochim.Biophys.Acta 317, 364-379.
- SUBIRANA, J.A. (1975)
On the biological role of basic proteins in spermatozoa
and during spermatogenesis.
in "The Biology of the Male Gamete" (Duchett J.C. and
Pacey P.A., eds) Academic Press, New York, pp.239-244.

- 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.
- THOMA, F., KOLLER, T. 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.
- TOBITA, T., TSUTSUMI, H., KATO, A., SUZUKI, H., NOMOTO, M., NAKANO, M. and ANDO, T. (1983)
Complete amino acid sequence of boar protamine.
Biochim.Biophys.Acta 744, 141-146.
- TONIOLO, C., BONORA, G.M., MARCHIORI, F., BORIN, G. and FILIPPI, B. (1979)
Protamines . II - Circular dichroism study of the three main components of clupeine.
Biochim.Biophys.Acta 576, 429-439.
- VAN HELDEN, P. (1982)
A theoretical consideration of the lysine-rich histones : H1 from a mammal and an echinoderm, H5 from erythrocytes.
J.Theor.Biol. 96, 327-336.
- VANHOUTTE-DURAND, G., MIZON, J., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1977)
Histones from gonads of the star-fish *Asterias rubens*.
Comp.Biochem.Physiol. 57B, 121-126.
- VENDRELY, R. and VENDRELY, C. (1965)
V - Chemistry and cytochemistry of nucleic acids and nuclear proteins. Protoplasmatologia band V. in "Biochemistry of histones and protamines" Springer-Verlag, Wien, pp.39-88.
- VON HOLT, C., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F. and STRICKLAND, M. (1979)
More histone structure.
FEBS Letters 100, 201-218.
- WAGNER, T.E. and YUN, J.S. (1981)
Arch.Androl. 6, 47-51 et 7, 251-257.
- WARRANT, R.W. and KIM, S.H. (1978)
 α -helix-double helix interaction shown in the structure of a protamine-transfer RNA complex and a nucleoprotamine model.
Nature 271, 130-135.
- WEINTRAUB, H. and VAN LENTE, F. (1974)
Dissection of chromosome structure with trypsin and nuclease.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 4249-4253.

- WILHELM, F.X. and CHAMPAGNE, M. (1969)
Dissociation de la nucléoprotéine d'érythrocyte de Poulet par les sels.
Eur.J.Biochem. 10, 102-109.
- WYROBEK, A.J., MEISTRICH, M.L., FURRER, R. and BRUCE, W.R. (1976)
Physical characteristics of mouse sperm nuclei.
Biophys.J. 16, 811-825.
- YULIKOVA, E.P., EVSEENKO, L.K., BARATOVA, L.A., BELYANOVA, L.P.,
RYBIN, V.K. and SILAEV, A.B. (1976)
Bioorg.Khim. 2, 1613-1617.
- YULIKOVA, E.P., RYBIN, V.K. and SILAEV, A.B. (1979)
Bioorg.Khim. 5, 5-10.

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse ont fait l'objet des publications suivantes :

Primary structure of histone H2A from nucleated erythrocyte of the marine worm *Sipunculus nudus*.

Presence of two forms of H2A in the sipunculid chromatin.

Daniel KMIECIK, Maurice COUPPEZ, Denise BELAÏCHE and Pierre SAUTIERE (1983)

Eur.J.Biochem. 135, 113-121.

Characterization of the histones and protamines from the sperm of the marine worm *Platynereis dumerilii*.

Daniel SELLOS and Daniel KMIECIK (1984)

Comp.Biochem.Physiol. (acceptée pour publication)

Complete amino acid sequence of the two variants of a sperm specific histone H1 from the sea worm *Platynereis dumerilii*.

Daniel KMIECIK, Daniel SELLOS, Denise BELAÏCHE and Pierre SAUTIERE (1984)

Eur.J.Biochem. (soumise pour publication)



Sipunculus nudus L. (Classe des Sipunculien)



Platynereis dumerilii (Annélide polychète errant)

II - 1 SÉQUENCE COMPLÈTE DE L'HISTONE H2A DE L'ÉRYTHROCYTE
NUCLÉÉ DE SIPONCLE (*SIPUNCULUS NUDUS*)

Primary structure of histone H2A from nucleated erythrocyte of the marine worm *Sipunculus nudus*

Presence of two forms of H2A in the sipunculid chromatin

Daniel KMIECIK, Maurice COUPPEZ, Denise BELAICHE, and Pierre SAUTIERE

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

(Received March 17/June 7, 1983) – EJB 83 0263

The complete amino acid sequence (123 residues) of histone H2A from erythrocytes of the marine worm *Sipunculus nudus*, has been established from data provided by automated sequence analysis of large fragments generated by V8 staphylococcal protease digestion of histone H2A and by limited hydrolysis of the protein with α -chymotrypsin and from structural studies of tryptic peptides of the protein.

By comparison with calf homologous histone, the sipunculid histone H2A shows 6 deletions and 13 substitutions. Six of the substitutions are non-conservative.

Most of the evolutionary changes are mainly observed in the basic amino-terminal and carboxy-terminal regions of the molecule, which are the primary DNA-binding sites. Few conservative point changes are observed in the central region (residues 18–118) which interacts strongly with histone H2B to form the dimer H2A-H2B. 60% of the H2A molecules were found phosphorylated on the amino-terminal residue, *N*-acetyl-serine. The high content of phosphorylated histone H2A in the sipunculid erythrocyte chromatin could probably be related to smaller repeat length (177 ± 5 base pairs) of nucleosomal DNA and to nuclear inactivation and chromatin condensation.

Sipunculid sea worms form an isolated ancestral phylum (Fig. 1) whose origin dates back to the Cambrian period. The sipunculid erythrocytes are nucleated and contain hemerythrin, a respiratory pigment which differs from that of vertebrates.

The first investigations on nuclear basic proteins of *Sipunculus nudus* erythrocyte chromatin were intended to look for the presence of an erythrocyte-specific histone homologous to the avian erythrocyte histone H5 and for evolutionary variations in histones H2A and H2B [1, 2]. Since sipunculid H2A and H2B were found to be markedly different from the homologous histones in vertebrates [3–5], it was therefore of interest to investigate the primary structure of both histones.

According to Mazen et al. [2], the differences could probably be associated with a smaller repeat length of the nucleosomal DNA (177 ± 5 base pairs). Moreover the sequence determination of sipunculid H2A takes place in a study of the structural variations of histone H2A undertaken in our laboratory in organisms widely separated on the evolutionary scale [3–9]. In this paper we present the

Abbreviations. TosLysCH₂Cl, *N*-tosyllysyl chloromethyl ketone; TosPheCH₂Cl, *N*-tosylphenylalanyl chloromethyl ketone; PhMeSO₂F, phenylmethylsulfonyl fluoride; *i*Pr₂PF, diisopropylfluorophosphate; dansyl-, 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl.

Enzymes. *Staphylococcus aureus* protease (EC 3.4.21.19); α -chymotrypsin (EC 3.4.21.1); trypsin (EC 3.4.21.4); carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1); carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2).

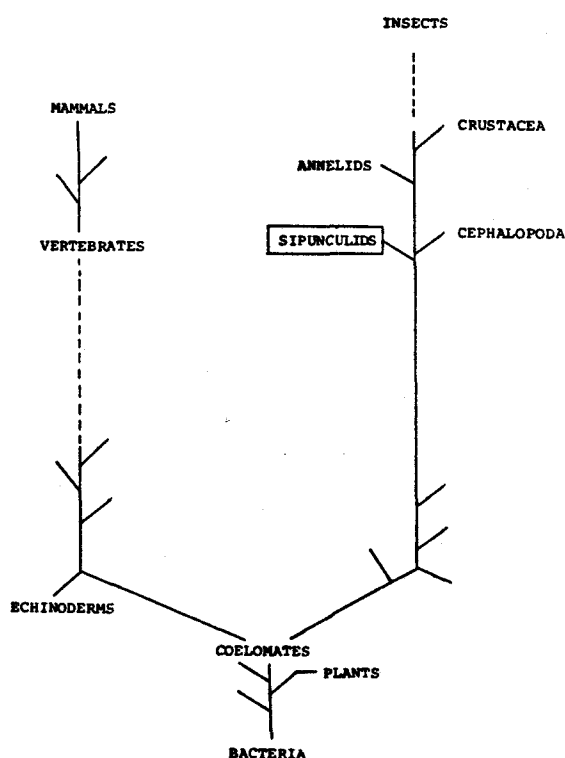


Fig. 1. Phylogenetic position of the sipunculids

complete amino acid sequence of sipunculid erythrocyte H2A established from structural data obtained essentially from large peptides generated by hydrolysis of the protein with V8 staphylococcal protease and chymotrypsin.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Staphylococcal V8 protease was from Miles laboratories. Trypsin (treated with TosPheCH₂Cl) and carboxypeptidase A (treated with PhMeSO₂F) were obtained from Worthington, α -chymotrypsin (treated with TosLysCH₂Cl) was from Merck. Carboxypeptidase B (treated with iPr₂PF) was 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 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

Worms were dug out of the sludge of river mouths on the Brittany coast. As soon as the worms were collected, nucleated erythrocytes were separated from the coelomic liquid by centrifugation. Nuclei were prepared as described by Mazen et al. [1] in the presence of 0.5 mM PhMeSO₂F.

Histones were extracted from the nuclear pellet with 0.25 M HCl and precipitated with acetone (9 vol.) at -20 °C. The precipitated histones were recovered by centrifugation at 4000 × g for 20 min at -20 °C and dried *in vacuo*. Histone H2A was isolated from the whole histone by gel filtration chromatography on a Bio-Gel P-10 column (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

The purity of the protein was assessed by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 3.2 in 6.25 M urea [10] 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 vacuo* 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 terminus. Hydrazinolysis of the amino-terminal tryptic peptide followed by dansylation at pH 3.0, was used to identify the blocked amino terminus as described in [11]. The dansylhydrazide derivative was identified by thin-layer chromatography on micropolyamide sheets [12].

Identification of O-phosphoserine. For identification of O-phosphoserine, histone H2A and the amino-terminal tryptic peptides were hydrolysed for 2 h at 110 °C under vacuum with 6 M HCl [13]. The hydrolysates were submitted to electrophoresis at 2500 V for 2 h on Whatman 3MM paper at pH 1.9 (acetic acid/formic acid/water, 35:10:400, by

vol.). O-Phosphoserine and O-phosphothreonine (Sigma) were used as markers.

Carboxy-terminal analysis. Histone H2A (0.84 mg, 60 nmol) was dissolved in 0.15 ml of 0.2 M N-methylmorpholine acetate pH 8.5 and digested at 37 °C with carboxypeptidase B (0.2 µg). At 30 min, an aliquot (0.05 ml) was taken off, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. Carboxypeptidase A (1.7 µg) was then added. At 60 min and 120 min following addition of carboxypeptidase A, aliquots (0.05 ml) were taken off and treated as above. The released amino acids were analysed on the amino acid analyser.

Enzymatic hydrolyses. Histone H2A (70 mg, 5 µmol) was hydrolysed with V8 *Staphylococcus aureus* protease in 0.05 M ammonium acetate (14 ml), at pH 4.0, and 37 °C for 20 h using an enzyme/substrate ratio of 1/50 (w/w). The hydrolysate was then freeze-dried. The limited chymotryptic hydrolysis of histone H2A (20 mg, 1.5 µmol) was performed in 0.5 M NaCl, 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.3, at 19 °C for 150 min using an enzyme/substrate ratio of 1/1000 (w/w). After lowering the pH at 3.0, the hydrolysate was freeze-dried. The tryptic digestion of histone H2A (40 mg, ≈ 3 µmol) was carried out in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0 at 37 °C for 4 h using an enzyme/substrate ratio of 1/50 (w/w). The digestion was stopped by lowering the pH at 3.5 with formic acid. The insoluble material formed upon acidification of the tryptic hydrolysate and corresponding to large hydrophobic peptides was collected by centrifugation. The pellet was washed twice in 10% formic acid, dissolved in 0.1 M NH₄OH and freeze-dried. The soluble fraction of the tryptic digest consisting mainly of small hydrophilic peptides was freeze-dried.

Fractionation of peptides. The peptides obtained by hydrolysis of histone H2A with V8 staphylococcal protease were separated by chromatography on a Bio-Gel P 10 column (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl, saturated with chloroform. The chymotryptic hydrolysate was fractionated on a Sephadex G-100 column (200 × 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl, saturated with chloroform. The large hydrophobic tryptic peptides were separated by reverse-phase liquid chromatography on a column of C₁₈ µ Bondapak (Waters Associates) using a Waters Associates ALC/GPC 244 apparatus equipped with a U6K sample injector and a Cecil 212 variable-wavelength ultraviolet monitor. The column was equilibrated in 0.05% trifluoroacetic acid containing 10% acetonitrile (v/v). The peptides were eluted with a linear gradient of 10–50% of acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. The small hydrophilic tryptic peptides were separated by ion-exchange chromatography on a Chromobeads P column (Technicon Corporation) as described in [6].

Sequence analysis. Automated Edman degradation of large peptides was carried out in a Beckman 890 C sequencer using a dimethylbenzylamine program (082773) [14] or a dimethylallylamine program (102974) in the presence of polybrene [15, 16]. Small peptides were sequenced by manual Edman degradation [17]. The phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified by high-pressure liquid chromatography as described in [7].

Nomenclature of peptides. Peptides obtained by cleavage of the protein at glutamyl residues with the V8 staphylococcal protease were designated SP-. Chymotryptic and tryptic peptides were designated by Ch- and T- respectively. Peptides were numbered according to their position in the sequence of the protein.

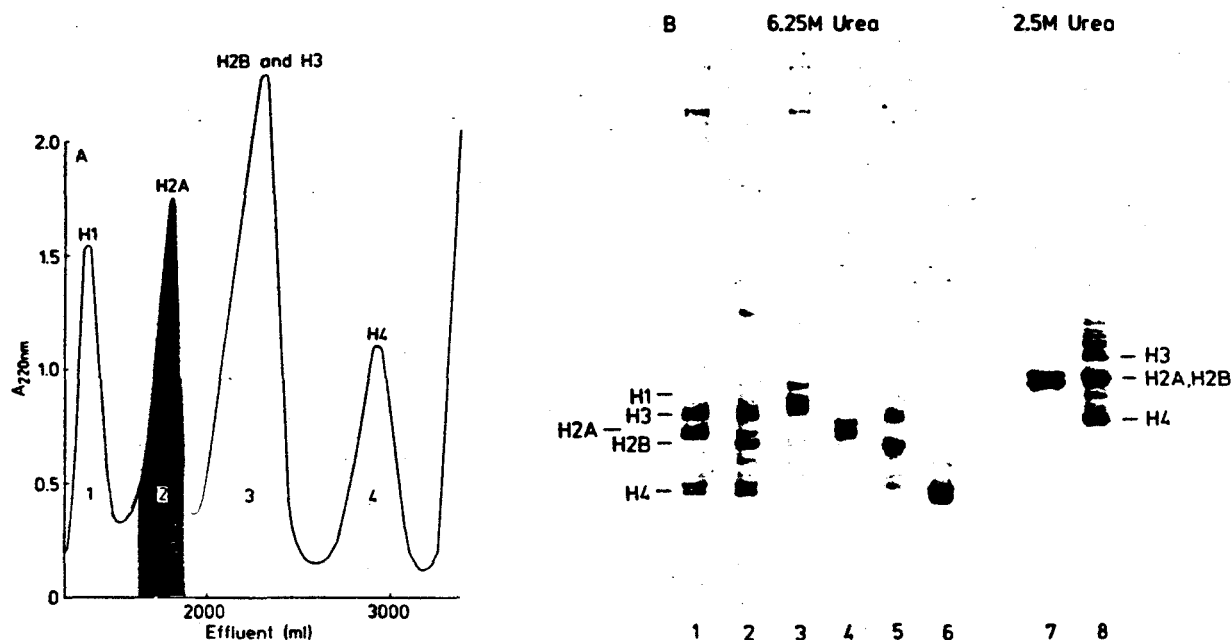


Fig. 2. (A) Bio-Gel P10 chromatography and (B) electrophoretic analysis of whole histone from sipunculid erythrocyte. (A) 100 mg of material were dissolved in 6 ml 6 M guanidine chloride, 0.1 M Tris, pH 8.0, 5% 2-mercaptoethanol and left under nitrogen at room temperature for 24 h before chromatography. The solution was then centrifuged and applied to a Bio-Gel P10 column (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. The flow rate was 60 ml/h and 18 ml - fractions were collected. (B) Fractions obtained in A were subjected to electrophoresis on polyacrylamide slab gels (15 × 10 cm) at 22 mA for 3 h at pH 3.2 in 6.25 M urea (lanes 1-6) and at pH 2.7 in 2.5 M urea (lanes 7, 8) [10]. Migration was 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.). Lane 1, whole histone from calf thymus; lanes 2 and 8, whole histone from sipunculid erythrocyte; lane 3, peak 1 from A; lanes 4 and 7, peak 2 from A; lane 5, peak 3 from A; lane 6, peak 4 from A.

RESULTS

Bio-Gel P10 chromatography of whole histone from *Sipunculus* erythrocyte yielded four fractions (Fig. 2A). Histone H2A was obtained free of contamination in fraction 2 (Fig. 2B, slot 4). Histones H1 and H4 were also obtained directly in pure form from fractions 1 and 4 respectively (Fig. 2B, slots 3 and 6). Fraction 3 is a mixture of histones H2B and H3 (Fig. 2B, slot 5). On polyacrylamide gel electrophoresis at pH 3.2 in 6.25 M urea, histone H2A appears as two bands stained with approximately the same intensity. At this concentration of urea, the electrophoretic migration of H2A is intermediate between that of H3 and H2B. In 2.5 M urea at pH 2.7, H2A comigrates with H2B (Fig. 2B, slots 7 and 8). Of the two bands of *Sipunculus* H2A which are observed in gel electrophoresis at acidic pH (Fig. 2B, slots 4 and 7), the slow-moving one corresponds to mono-phosphorylated H2A, whereas the fast-moving band represents the non-phosphorylated H2A. The phosphate group was shown to be located on the serine residue at the amino terminus of the protein, following the isolation of the amino-terminal tryptic peptide T-1a, AcSer(P)-Gly-Arg.

Table 1 shows the amino acid composition of sipunculid histone H2A. By comparison with calf homologous histone, the sipunculid histone H2A is characterized by a higher content of serine and isoleucine, a lower content of threonine, glutamic acid, alanine, valine, leucine, lysine and arginine, the presence of one residue of methionine and the lack of two residues of histidine.

Sipunculid histone H2A has a blocked amino group as established as acetyl by hydrazinolysis followed by dansylation of the tripeptide AcSer-Gly-Arg T-1b generated by tryptic

hydrolysis of the protein. The carboxy-terminal sequence of histone H2A was established as -Lys-Ser-Lys after digestion with carboxypeptidases B and A.

With the method of automated sequencing, the strategy used for the determination of the primary structure of sipunculid histone H2A was firstly intended to produce a minimum of large adjacent or overlapping fragments by highly specific or limited enzymatic cleavages (Fig. 3). Secondly, tryptic hydrolysis of the protein generated small peptides (see Table 2) which were used to confirm the structural data provided by the automated sequencing of the large fragments.

Thus, the cleavage of sipunculid histone H2A at glutamyl residues yielded four fragments which were separated on Bio-Gel P10 (Fig. 4). Their amino acid compositions are presented in Table 1. Fragments SP-1, SP-2, SP-3 and SP-4 together accounted for the total number of residues present in the protein. Since the peptide SP-1 contains most of the serine, glycine and arginine residues found in histone H2A, it obviously originates from the amino-terminal region of the protein (residues 1-55). As observed previously in V8 staphylococcal protease hydrolysates of histones H4 and H2A, the *N*-acetylserine residue present at the amino terminus of the fragment SP-1 was found to be partially deacetylated. The fragment SP-1 was therefore successfully submitted to automated Edman degradation over 33 steps (Table 3, Fig. 8). The sequence of the fragment SP-2 (residues 56-63) was established by manual Edman degradation (Fig. 8). The peptides SP-3 (residues 64-91) and SP-4 (residues 92-123) were completely sequenced by automated Edman degradation (Tables 4 and 5, Fig. 8). The carboxy-terminal position of SP-4 was ascertained by digestion of the peptide with

Table 1. Amino acid composition of sipunculid erythrocyte histone H2A and of peptides used for the sequence determination. Results are expressed as number of residues per molecule of protein or peptide. Values in parentheses are residues per molecule derived from the final sequence; these for threonine and serine, in the protein, are zero-time extrapolations

Amino acid	Histone H2A		SP-1 (residues 1-55)	SP-2 (residues 56-63)	SP-3 (residues 64-91)	SP-4 (residues 92-123)	Ch-1 (residues 31-123)	Ch-2 (residues 85-123)
	calf	sipunculid						
Aspartic acid	8	8.2 (8)	1.2 (1)		4.7 (5)	2.1 (2)	7.9 (8)	4.2 (4)
Threonine	5	3.5 (3)			0.9 (1)	1.9 (2)	2.9 (3)	2.0 (2)
Serine	4	7.4 (7)	5.0 (5)			2.0 (2)	2.7 (2)	2.0 (2)
Glutamic acid	12	11.5 (11)	2.6 (3)	2.2 (2)	3.1 (3)	3.3 (3)	10.2 (10)	5.9 (5)
Proline	5	5.2 (5)	2.2 (2)		1.1 (1)	2.7 (2)	3.8 (4)	2.0 (2)
Glycine	14	13.7 (14)	10.3 (10)		1.5 (1)	3.0 (3)	7.6 (7)	3.4 (3)
Alanine	16	14.7 (15)	6.6 (7)	1.9 (2)	4.0 (4)	2.2 (2)	13.2 (13)	3.4 (3)
Valine	8	7.1 (7)	2.3 (3)	1.0 (1)		2.9 (3)	5.4 (6)	3.0 (3)
Methionine	-	0.9 (1)	0.2 (1)				0.6 (1)	
Isoleucine	6	6.6 (7)	1.8 (2)		3.2 (3)	1.9 (2)	5.0* (6)	3.0 (3)
Leucine	16	14.5 (15)	4.2 (4)	2.0 (2)	3.2 (3)	5.9 (6)	13.7 (14)	7.0 (6)
Tyrosine	3	2.5 (3)	1.8 (2)	0.9 (1)			2.9 (3)	
Phenylalanine	1	1.2 (1)	1.1 (1)					
Histidine	4	2.1 (2)	1.0 (1)		0.9 (1)		1.1 (1)	
Lysine	14	13.0 (13)	6.6 (6)		2.3 (2)	4.9 (5)	8.8 (8)	5.7 (5)
Arginine	12	10.7 (11)	7.3 (7)		4.0 (4)		7.0 (7)	1.2 (1)
Number of residue	129	123	55	8	28	32	93	39

* This value is low due to incomplete cleavage of an Ile-Ile bond.

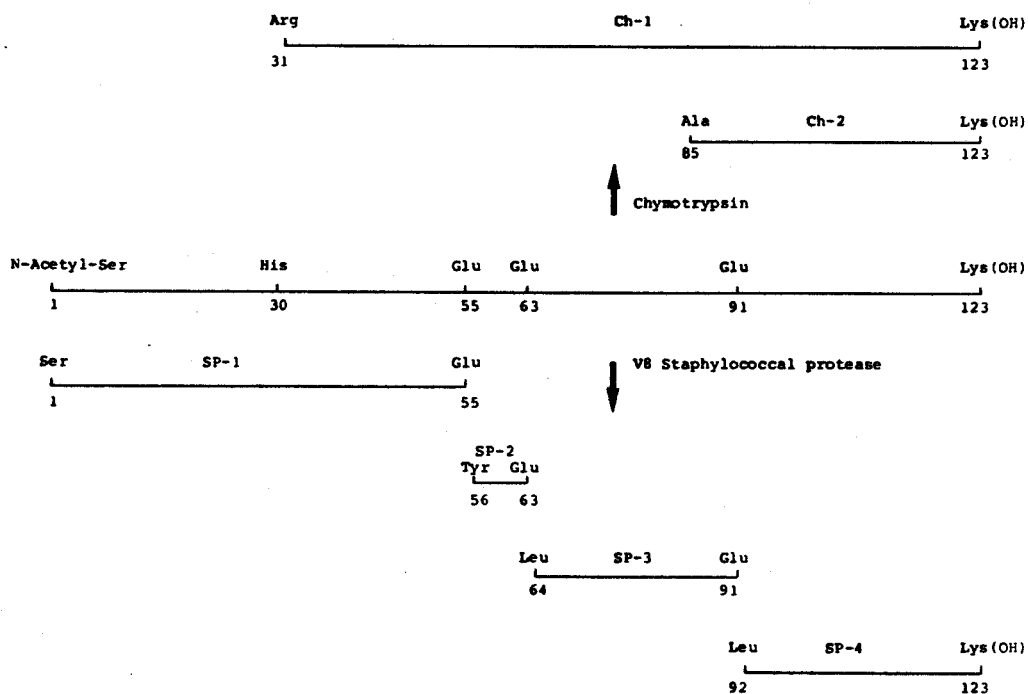


Fig. 3. Strategy used for the determination of the amino acid sequence of the sipunculid erythrocyte histone H2A

carboxypeptidases B and A. Its carboxy-terminal sequence was established as -Lys-Ser-Lys; it corresponds to the carboxy-terminal sequence of the protein.

The alignment of fragments SP-1, SP-2 and SP-3 was obtained from a structural study of the large chymotryptic peptides generated by limited hydrolysis of the sipunculid histone H2A with chymotrypsin. Hydrolysis was carried out at high ionic strength (0.5 M NaCl) which allows the protein

to have a maximum of secondary and tertiary conformations (globular structure), thus making most of the potential cleavage sites located in the organized domains of the histone H2A inaccessible to the enzyme. The fractionation of the limited chymotryptic hydrolysate on Sephadex G-100 yielded two large peptides Ch-1 and Ch-2 which were eluted in peaks 2 and 3 respectively (Fig. 5). Peptide Ch-1 although slightly contaminated by a smaller peptide, was used without

Table 2. Amino acid composition of tryptic peptides of *Spiraeid* erythrocyte histone H7A.

Amino acids	H7A	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T-6	T-7	T-8	T-9	T-10	T-11	T-12	T-13	T-14	T-15	T-16	T-17	T-18	T-19	T-20	T-21
Aspartic acid	8											1.0 (1)	1.2 (1)	2.0 (2)		1.0 (1)		3.0 (3)	1.1 (1)			
Threonine	3																		1.0 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)	
Serine	7	1.0 (1)										1.0 (1)	2.1 (2)						1.2 (1)	2.1 (2)	0.9 (1)	1.0 (1)
Glutamic acid	11																		1.0 (1)	1.9 (2)	2.1 (2)	0.9 (1)
Proline	5																		1.1 (1)	1.9 (2)		
Glycine	14	1.1 (1)	3.2 (3)									1.1 (1)	3.3 (3)						3.1 (3)	2.0 (2)		
Alanine	15											1.0 (1)	9.0 (9)						1.1 (1)	2.0 (2)		
Valine	7												2.7 (3)							2.0 (2)		
Methionine	1												0.8 (1)									
Isoleucine	7									0.9 (1)			1.0 (1)							1.9 (2)		
Leucine	15									1.0 (1)	2.0 (2)		0.8 (1)						1.0 (1)	4.8 (5)		
Tyrosine	3											1.0 (1)	1.7 (2)									
Phenylalanine	1									0.8 (1)												
Histidine	2											1.0 (1)	1.0 (1)									
Lysine	13		1.8 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)					1.3 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)	1.1 (1)						1.1 (1)	1.0 (1)	2.1 (2)	1.0 (1)
Arginine	11	0.9 (1)										0.9 (1)	1.1 (1)						1.0 (1)	1.0 (1)		
Total	123	5	5	2	2	2	2	3	3	3	3	7	29	3	1	2	6	7	25	6	4	2

Table 3. Automated Edman Degradation of peptide SP-1

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	1	Ser	12	HPLC
2	2	Gly	54	HPLC
3	3	Arg	59	HPLC
4	4	Gly	64	HPLC
5	5	Lys	39	HPLC
6	6	Gly	53	HPLC
7	7	Gly	65	HPLC
8	8	Lys	36	HPLC
9	9	Ala	41	HPLC
10	10	Lys	33	HPLC
11	11	Gly	45	HPLC
12	12	Lys	34	HPLC
13	13	Ser	4	HPLC
14	14	Lys	29	HPLC
15	15	Ser	4	HPLC
16	16	Arg	34	HPLC
17	17	Ser	2	HPLC
18	18	Ser	3	HPLC
19	19	Arg	32	HPLC
20	20	Ala	17	HPLC
21	21	Gly	24	HPLC
22	22	Leu	13	HPLC
23	23	Gln	15	HPLC
24	24	Phe	3	HPLC
25	25	Pro	6	HPLC
26	26	Val	-	HPLC
27	27	Gly	23	HPLC
28	28	Arg	14	HPLC
29	29	Ile	9	HPLC, GC
30	30	His	-	HPLC
31	31	-	-	HPLC
32	32	Leu	6	HPLC
33	33	Leu	9	HPLC

HPLC, Double identification of phenylthiohydantoins of amino acids by high pressure liquid chromatography on columns of C18 μ Bondapak and of cyanopropylsilane [22, 25].
GC, Identification by gas chromatography [26].

Table 4. Automated Edman Degradation of peptide SP-3

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	64	Leu	1172	HPLC
2	65	Ala	632	HPLC
3	66	Gly	652	HPLC
4	67	Asn	471	HPLC
5	68	Ala	487	HPLC
6	69	Ala	553	HPLC
7	70	Arg	549	HPLC
8	71	Asp	309	HPLC
9	72	Asn	417	HPLC
10	73	Lys	147	HPLC
11	74	Lys	201	HPLC
12	75	Thr	47	HPLC
13	76	Arg	242	HPLC
14	77	Ile	135	HPLC, GC
15	78	Ile	204	HPLC, GC
16	79	Pro	104	HPLC
17	80	Arg	195	HPLC
18	81	His	-	HPLC
19	82	Leu	173	HPLC
20	83	Gln	57	HPLC
21	84	Leu	201	HPLC
22	85	Ala	111	HPLC
23	86	Ile	131	HPLC, GC
24	87	Arg	127	HPLC
25	88	Asn	55	HPLC
26	89	Asp	49	HPLC
27	90	Glu	5	HPLC
28	91	Glu	9	HPLC

See legend of Table 3.

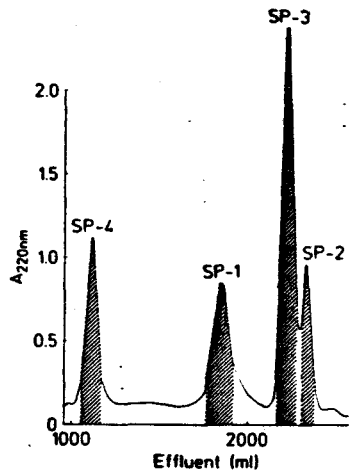


Fig. 4. Elution of pattern of V8 staphylococcal protease fragments of sipunculid histone H2A fractionated on Bio-Gel P10. The column (150 × 5 cm) was equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Fractions of 18 ml were collected at a flow rate of 72 ml/h

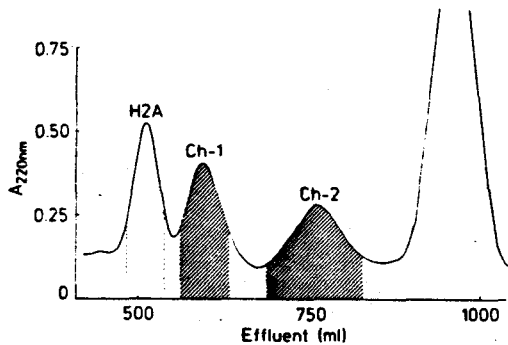


Fig. 5. Elution pattern of peptides generated by limited chymotryptic hydrolysis of sipunculid histone H2A. The peptides were fractionated on a column of Sephadex G-100 (200 × 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Fractions of 4.7 ml were collected at a flow rate of 14.2 ml/h

further purification. Peptide Ch-2 was purified by chromatography on a carboxymethyl-cellulose column as described in [18]. Their amino acid compositions are given in Table 1. Peptide Ch-1 (93 residues) corresponds to the C-terminal two-thirds of the H2A molecule (residues 31–123). 32 steps of automated Edman degradation were performed on peptide Ch-1 (Table 6). The identification of two phenylthiohydantoin derivatives of amino acids at each step of the degradation revealed that peptide Ch-1 was contaminated by a peptide (peptide Ch-1a, residues 34–123) obtained from the partial cleavage of the protein at leucine 33 (Fig. 8). Peptide Ch-2 (39 residues) clearly originates from the carboxy-terminal part of histone H2A as shown by its high content in aspartic acid and glutamic acid and its low content in arginine. It is generated by partial cleavage of the protein at leucine 84. Its amino-terminal sequence established by ten steps of automated Edman degradation (Table 7), provided the data necessary to align fragments SP-3 and SP-4 (Fig. 8).

All the data obtained from automated Edman degradation of staphylococcal protease fragments and of chymotryptic fragments were confirmed by structural studies of tryptic

Table 5. Automated Edman Degradation of peptide SP-4

Cycle number	Residue number	Residue	Yield nmol	Identification
1	92	Leu	827	HPLC
2	93	Asn	691	HPLC
3	94	Lys	641	HPLC
4	95	Leu	603	HPLC
5	96	Leu	764	HPLC
6	97	Ser	195	HPLC
7	98	Gly	-	HPLC
8	99	Val	493	HPLC, GC
9	100	Thr	313	HPLC
10	101	Ile	435	HPLC
11	102	Ala	590	HPLC
12	103	Gln	555	HPLC
13	104	Gly	941	HPLC
14	105	Gly	1143	HPLC
15	106	Val	367	HPLC
16	107	Leu	317	HPLC
17	108	Pro	197	HPLC
18	109	Asn	301	HPLC
19	110	Ile	181	HPLC
20	111	Gln	388	HPLC
21	112	Ala	241	HPLC
22	113	Val	203	HPLC
23	114	Leu	159	HPLC
24	115	Leu	218	HPLC
25	116	Pro	80	HPLC
26	117	Lys	99	HPLC
27	118	Lys	112	HPLC
28	119	Thr	43	HPLC
29	120	Gln	125	HPLC
30	121	Lys	66	HPLC
31	122	Ser	13	HPLC
32	123	Lys	43	HPLC

See legend of Table 3.

Table 6. Automated Edman Degradation of peptide Ch-1

Cycle number	Major peptide Ch-1			Minor peptide Ch-1a			Identification
	Residue number	Residue	Yield nmol	Residue number	Residue	Yield nmol	
1	31	Arg	296	34	Arg	-	HPLC
2	32	Leu	40	35	Lys	30	HPLC
3	33	Leu	39	36	Gly	31	HPLC
4	34	Arg	140	37	Asn	25	HPLC
5	35	Lys	46	38	Tyr	42	HPLC
6	36	Gly	46	39	Ala	49	HPLC
7	37	Asn	37	40	Glu	22	HPLC
8	38	Tyr	48	41	Arg	83	HPLC
9	39	Ala	53	42	Ile	-	HPLC, GC
10	40	Glu	-	43	Gly	48	HPLC
11	41	Arg	120	44	Ala	33	HPLC
12	42	Ile	33	45	Gly	28	HPLC, GC
13	43	Gly	48	46	Ala	48	HPLC
14	44	Ala	-	47	Pro	-	HPLC
15	45	Gly	41	48	Val	-	HPLC, GC
16	46	Ala	44	49	Tyr	24	HPLC
17	47	Pro	31	50	Leu	22	HPLC, GC
18	48	Val	-	51	Ala	27	HPLC, GC
19	49	Tyr	52	52	Ala	47	HPLC, GC
20	50	Leu	49	53	Val	-	HPLC, GC
21	51	Ala	56	54	-	-	HPLC, GC
22	52	Ala	41	55	Glu	-	HPLC, GC
23	53	Val	-	56	Tyr	18	HPLC, GC
24	54	-	-	57	Leu	27	HPLC, GC
25	55	Glu	15	58	Ala	22	HPLC
26	56	Tyr	22	59	Ala	23	HPLC
27	57	Leu	29	60	Glu	6	HPLC, GC
28	58	Ala	28	61	-	-	HPLC
29	59	Ala	27	62	Leu	11	HPLC
30	60	Glu	14	63	Glu	-	HPLC, GC
31	61	Val	-	64	Leu	18	HPLC, GC
32	62	Leu	26	65	Ala	16	HPLC

See legend of Table 3.

Table 7. Automated Edman Degradation of peptide Ch-2

Cycle Number	Residue number	Residue	Yield mol	Identification
1	85	Ala	17	NPLC, CC
2	86	Ile	-	NPLC, CC
3	87	Arg	13	NPLC
4	88	Asn	8	NPLC
5	89	Asp	6	NPLC
6	90	Glu	-	NPLC
7	91	Glu	-	NPLC
8	92	Leu	-	NPLC
9	93	Asn	-	NPLC
10	94	Lys	-	NPLC

See legend of Table 3.

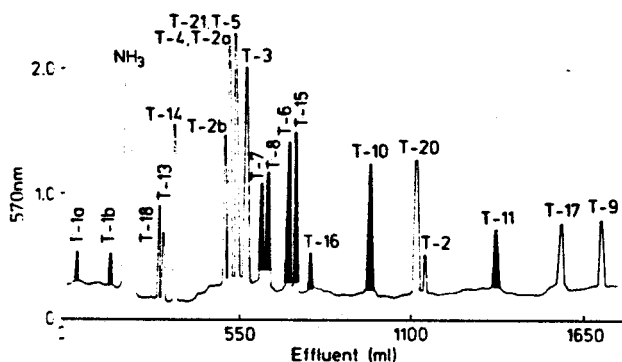


Fig. 6. Elution pattern of tryptic peptides from sipunculid histone H2A. The peptides were fractionated on a column of Chromobeads P (60 x 0.35 cm) with pyridine/formate and pyridine/acetate buffers [6]. Fractions of 5.5 ml were collected at 33 ml/h. Peptides are numbered according to their position in the sequence of the protein. Hatched peaks corresponds to arginine-containing peptides

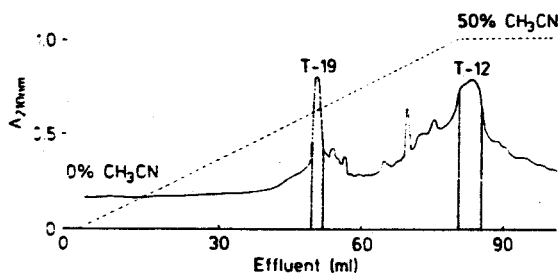


Fig. 7. Elution pattern of large hydrophobic tryptic peptides of histone H2A fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. The insoluble material formed upon acidification of the tryptic hydrolysate (1 mg) was loaded on a column of C₁₈ μ Bondapak (0.39 x 30 cm) equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid. The column was eluted with a linear gradient (----) from 0-50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. Fractions of 1.2 ml were collected at a flow rate of 2 ml/min. The elution of peptides was monitored at 210 nm. The peptides were numbered according to their position in the sequence of the molecule.

peptides generated from the native protein. The elution diagram of the small tryptic peptides separated on Chromobeads P is shown in Fig. 6. The separation of the large hydrophobic tryptic peptides by reverse-phase liquid chromatography is presented in Fig. 7. The amino acid composition of tryptic peptides is given in Table 2. Two peptides indicated in Fig. 6 by T-1a and T-1b were found to

Table 8. Comparison of the sequences of histones H2A from marine invertebrates and from calf. Deletions are indicated by ----. Numbering in this table and in the text refers to sequence positions in histone H2A

Calf thymus [3]	6	11	15	17	20	30	33	41	43	51	55	59	62	76	79	99	121	125	129
	Gln-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser-Arg	Val	Leu	Glu	Val	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Ile	Glu	Lys	Glu-Ser-His-His-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys	
<i>Sipunculida</i> erythrocyte	6	10	15	19	29	32	40	42	50	54	58	61	75	78	97	98	120	123	123
	Gly-Gly-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys-Ser-Lys-Ser-Arg-Ser-Ser-Arg	Ile	Leu	Glu	Ile	Leu	Met	Ala	Val	Thr	Ile	Ser-Gly	Gln	-----	Lys-Ser-Lys	-----	-----	-----	-----
Cuttlefish testis [7]	-----	Gly-Gly-Lys-Val-Lys-Gly-Lys-Ser-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser-Arg	Ile	Leu	Gln	Val	Val	Leu	Met	Ala	Val	Ser	Ile	Ser-Gly	Gln	-----	Lys-Ala	-----	Ala-Lys
Starfish gonads [9]	-----	Gly-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg-Ser-Ala	Val	Phe	Glu	Val	Leu	Met	Ala	Ile	Thr	Asn	Ser-Gly	-----	Ala	-----	Lys-Ala	-----	Ala-Lys
Sea urchin gonads [6]	-----	Gly-Ala-Lys-Gly-Lys-Ala-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg-Ser-Ser-Arg	Val	Phe	Asn	Val	Leu	Leu	Ala	Ile	Thr	Ile	Gly-Gly	Gly-Ser	-----	Lys-Ser	-----	Ser-Lys	-----

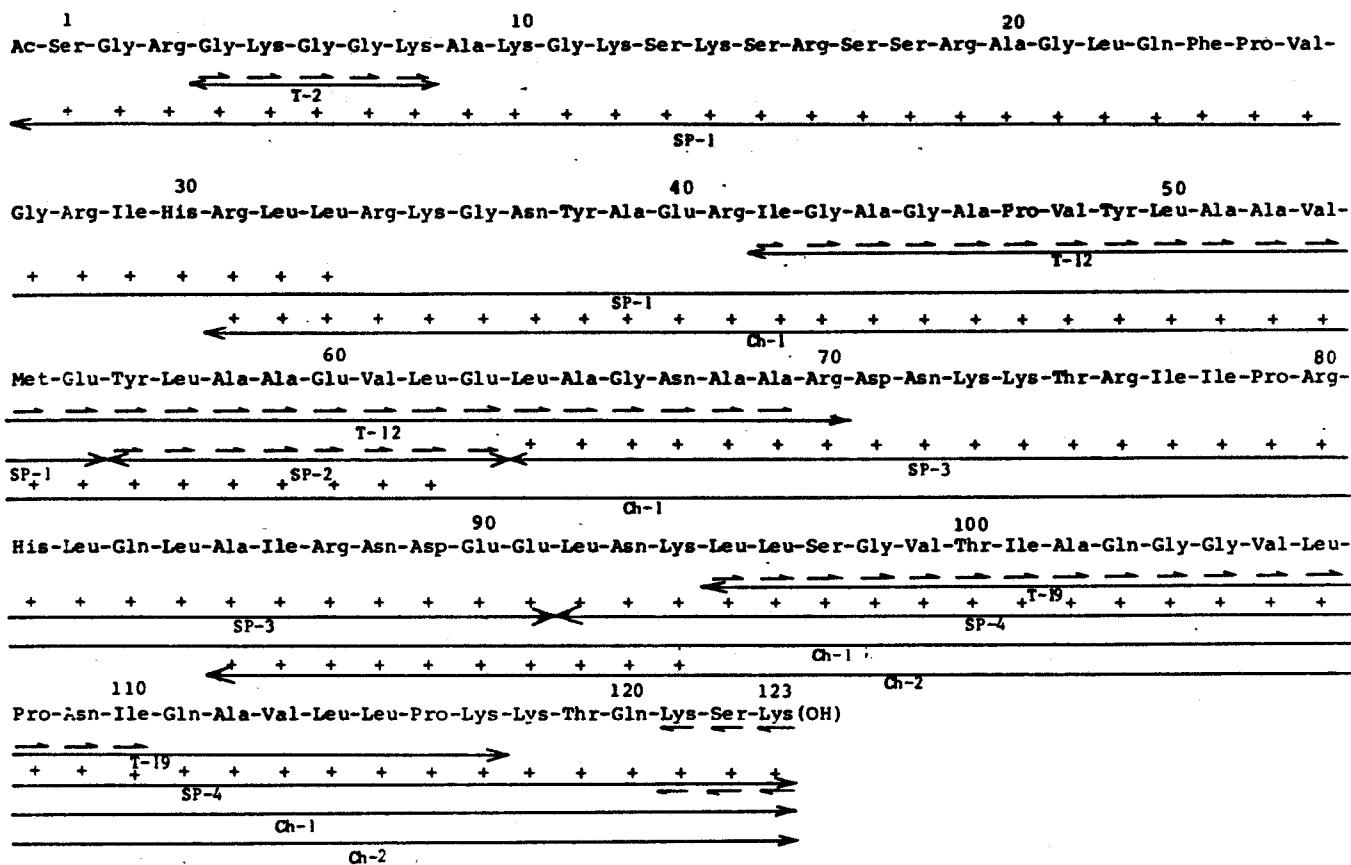


Fig. 8. Alignment of peptides and amino acid sequence of *Sipunculus histone H2A*. Methods used for determination of the sequence of peptides are indicated as follows: →, manual Edman degradation; ←, carboxypeptidase hydrolysis; + + +, automated Edman degradation; SP-, peptides obtained by cleavage of the protein with the V-8 staphylococcal protease; Ch-, chymotryptic peptides; T-, tryptic peptides

have an identical composition: Ser₁, Gly₁, Arg₁. Both have a blocked amino terminus. The blocking group was identified as acetyl after hydrazinolysis followed by dansylation. T-1a differs from T-1b by the presence of a phosphate group bound to serine. *O*-Phosphoserine was also identified in sipunculid histone H2A. The 6/4 molar ratio in which T-1a and T-1b were found in the H2A tryptic hydrolysate indicates that about 60% of the sipunculid H2A molecules are phosphorylated at serine 1. Peptide T-2, Gly-Lys-Gly-Gly-Lys, was obtained together with peptides T-2a, Gly⁵-Lys⁶, and T-2b, Gly⁶-Gly-Lys⁸. The incomplete cleavage of the bond Lys⁵-Gly⁶ led us to suspect the presence of an acetyl group on lysine 5, which is known to be a site of acetylation in histone H2A. However, when peptide T-2 was submitted to four steps of manual Edman degradation no phenylthiohydantoin derivative of ϵ -*N*-acetyllysine was found at the second step.

Peptide T-12 (residues 42–70) was used to align peptides SP-1, SP-2, SP-3 and to ascertain the presence of a methionine residue at position 54 (Fig. 8).

DISCUSSION

The amino acid sequence of sipunculid erythrocyte histone H2A (123 residues) shows by comparison with that of calf thymus H2A 13 substitutions and 6 deletions (Table 8). Changes occur mainly in the basic amino-terminal and carboxy-terminal regions of the protein (sequences 1–19 and 118–123 respectively) which are the primary DNA-binding

sites: thus a sequence of five amino acids (residues 122–126 in calf) is deleted in sipunculid histone H2A. They do not affect, however, the overall electrical charge of these regions. Moreover, the respective positions of the basic residues in the sequence 1–20 remain unchanged. Eight of these substitutions are conservative. Four substitutions and one deletion are observed in the sequence 1–19. The deletion of the glutamine residue at position 6 leads to complete structural identity between the amino-terminal sequences (residues 1–8) of histones H2A and H4. The deletion of the two residues of histidine (at positions 123 and 124 in the calf histone) has also been found in other marine invertebrates [6–9] and in fish [19]. From NMR spectroscopy data, this deletion does not produce any noticeable effect on the tertiary structure of histone H2A [20]. Seven substitutions take place in the highly organized region of sipunculid H2A (residues 20–117) which strongly interacts with histone H2B to form the dimer H2A-H2B. One of them is not conservative and involves the replacement of a polar charged residue by a neutral polar residue (Lys⁹⁹→Gly⁹⁸). The substitution Val→Ile which occurs at position 30 has already been observed in cuttlefish H2A [7] and in wheat histone variants H2A-1, H2A-2 and H2A-3 [21], whereas the substitution Leu→Met at position 54 was also found in H2A from cuttlefish and starfish [7, 9].

In sipunculid erythrocyte chromatin, about 60% of the H2A molecules were found phosphorylated at serine 1. Both forms of sipunculid H2A, phosphorylated and not phosphorylated, were obtained together free of contamination

through a single step of fractionation of whole histone by chromatography on Bio-Gel P 10. On polyacrylamide gel electrophoresis at acidic pH sipunculid H2A appears as two bands stained with approximately the same intensity. Phosphorylation of the amino-terminal *N*-acetylserine residue of histone H2A has been observed *in vivo*, in cultured cells [22] and regenerating rat liver [23]. *In vitro*, serine-1 and serine-19 were found phosphorylated at the same extent in calf and rat chloroleukemia H2A [24]. Generally it has been suggested that H2A phosphorylation might be correlated with heterochromatin condensation [25, 26]. The phosphorylation of sipunculid erythrocyte H2A could probably be related to nuclear inactivation and chromatin condensation following the observation that H2A is the only histone in avian erythrocyte which continues to be phosphorylated during the late stages of red cell maturation [27]. However, to our knowledge, the physiological phosphorylation of histone H2A to such an extent (60%) has never been observed previously. On the other hand this high rate of phosphorylation of sipunculid H2A, together with variations in the primary sequence of H2A and H2B could be related to a smaller repeat length (177 ± 5 base pairs) of nucleosomal DNA in the chromatin of *Sipunculus nudus* as suggested previously by Mazen et al. [2].

The authors are indebted to D. Sellos and Dr Y. Le Gal (Laboratoire de Biologie Marine, Collège de France, Concarneau, France) for help in collecting sipunculid worms. They acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of M. J. Dupire, T. Ernout and A. Hèmez. They thank also G. Briand and O. Hannedouche from the *Service Commun de Séquence Unité 16/ Unité 124 INSERM* (Lille) for the sequencer runs. The authors are grateful to M. Blanquet for editorial assistance. This work was supported by grant 77.5.048.2 from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) and grants from the *Centre National de la Recherche Scientifique* (ATP Chromatine 4203 and L.A. 268).

REFERENCES

- Mazen, A. & Champagne, M. (1976) *Exp. Cell. Res.* **103**, 119–125.
- Mazen, A., Champagne, M., Wilhelm, M. & Wilhelm, F. X. (1978) *Exp. Cell. Res.* **117**, 431–438.
- Sautière, P., Tyrou, D., Laine, B., Mizon, J., Ruffin, P. & Biserte, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* **41**, 563–576.
- Laine, B., Sautière, P. & Biserte, G. (1976) *Biochemistry*, **15**, 1640–1645.
- Laine, B., Kmićik, D., Sautière, P. & Biserte G. (1978) *Biochimie (Paris)* **60**, 147–150.
- Wouters, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1978) *Eur. J. Biochem.* **90**, 231–239.
- Wouters-Tyrou, D., Martin-Ponthieu, A., Briand, G., Sautière, P. & Biserte G. (1982) *Eur. J. Biochem.* **124**, 489–498.
- Chauvière, M., Sautière, P., Couppez, M. & Chevillier, P. (1982) *Comp. Biochem. Physiol.* **72 B**, 393–399.
- Martinage, A., Bélaiche, D., Dupressoir, T. & Sautière, P. (1983) *Eur. J. Biochem.* **130**, 465–472.
- Panyim, S. & Chalkley, R. (1969) *Arch Biochem. Biophys.* **130**, 337–346.
- Schmer, G. & Kriel, G. (1969) *Anal. Biochem.* **29**, 186–192.
- Doolittle, R. F. (1977) in *Advanced Methods in Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., ed.), pp. 38–54, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Cohen, P., Rylatt, D. B. & Nimmo, G.A. (1977) *FEBS Lett.* **76**, 182–186.
- Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Neurath, H. & Walsh, K. A. (1978) *Biochemistry*, **17**, 5672–5679.
- Tarr, G. E., Beecher, J. F., Bell, M. & McKean, D. (1978) *Anal. Biochem.* **84**, 622–627.
- Klapper, D. G., Wilde, C. E. & Capra, J. D. (1978) *Anal. Biochem.* **85**, 126–131.
- Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination* (Needleman, S. B., ed.) 2nd ed, pp. 232–279, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Briand, G., Kmićik, D., Sautière, P., Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. & Champagne, M. (1980) *FEBS Lett.* **112**, 147–151.
- Bailey, G. S. & Dixon, G. H. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 5463–5472.
- Bradbury, E. M., Cary, P. D., Crane-Robinson, C., Rattle, H. W. E., Boublik, M. & Sautière, P. (1975) *Biochemistry*, **14**, 1876–1885.
- Rodrigues, J. de A., Brandt, W. F. & Von Holt, C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 196–206.
- Sung, M. T. & Dixon, G. H. (1970) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **67**, 1616–1623.
- Sung, M. T., Dixon, G. H. & Smithies, O. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1358–1364.
- Martinage, A., Mangeat, P., Laine, B., Couppez, M., Sautière, P., Marchis-Mouren, G. & Biserte, G. (1980) *FEBS Lett.* **118**, 323–329.
- Gurley, L. R. & Walters, R. A. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 697–703.
- Halleck, M. S. & Gurley, L. R. (1980) *Exp. Cell Res.* **125**, 377–388.
- Ruiz-Carillo, A., Wangh, L. J. & Allfrey, V. G. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **174**, 273–290.

D. Kmićik, M. Couppez, D. Bélaiche, and P. Sautière,

Unité de Recherche 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 de Lille, Cite Hospitalière, 2 Place Verdun, F-59020 Lille-Cedex, Nord, France

COMMENTAIRE

La molécule d'histone H2A renferme trois domaines structuraux :

- Les extrémités N- et C-terminales (résidus 1 à 18 et 119 à 129) sont riches en acides aminés basiques et sont dépourvues de structure organisée.

- La zone centrale (19 à 118) renferme deux séquences très hydrophobes (43-71 et 100-119). Cette région interagit fortement avec l'histone H2B (32-125) comme l'ont montré Maurice COUPPEZ (Communication personnelle) et MOSS et coll. (1976) et possède une conformation globulaire. Les modifications de séquence dans cette région sont rares et de nature conservative.

BÖHM et coll. (1980, 1984) ont montré que les 11 résidus N-terminaux et les 10 résidus C-terminaux sont exposés dans la chromatine.

La plupart des modifications observées dans la séquence des histones H2A étudiées dans notre laboratoire (Figure 17) sont localisées dans les régions N- et C-terminales basiques. L'histone H2A de l'érythrocyte de Siphoncle comparée à l'histone homologue de thymus de Veau présente quatre délétions et douze substitutions dont six sont conservatives.

* La délétion d'un résidu de glutamine en position 6 (H2A de thymus de Veau) conduit à une identité structurale complète des histones H2A et H4 (résidus 1 à 8).

* La délétion de deux résidus d'histidine dans la région C-terminale est une caractéristique des histones H2A d'Invertébrés marins (Figure 17). Cette modification n'a pas d'influence sur la structure tertiaire de la molécule (BRADBURY et coll., 1975).

ESPÈCES	POSITION DES RÉSIDUS											
	6	8	10	12	14	16	19	30	33	41	43	
VEAU	Gln-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser-Arg-							-Val-	-Leu-	-Glu-	-Val-	
RAT							-Thr/ser-					
POULET							-Ser-					
OURSIN	---	-Ala-	-Gly-Lys-				-Ser-		-Phe-	-Asn-		
ETOILE DE MER	---						-Ser-	-Ser/Ala-	-Phe-	-Glu/Gln-		
SIPONCLE	---		-Lys-Gly-	-Ser-	-Ser-						-Ile-	
SEICHE	---		-Val-Lys-Gly-	-Ser-	-Thr-			-Ile-		-Gln-		

ESPÈCES	POSITION DES RÉSIDUS									
	51	55	59	62	76	79	98-99	121	129	
VEAU	Leu-	-Leu-	-Thr-	-Ile-	-Thr-	-Ile-	-Gly-Lys/Arg-	-Glu-Ser-His-His-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys (OH)		
RAT							-Lys/Arg-			
POULET							-Lys-	-Asp-	---	-Ala-Lys (OH) 128
OURSIN			-Ala-				-Gly-	-Gly-Ser	---	Lys-Ser --- Ser-Lys (OH) 125
ETOILE DE MER	Leu/Asx-	-Met-	-Ala-			-Asn-	-Ser-Gly-	---	Ala --- --- Lys-Ala ---	Ala-Lys (OH) 124
SIPONCLE		-Met-	-Ala-	-Val-			-Ser-Gly-	-Gln --- --- --- Lys --- ---		Ser-Lys (OH) 123
SEICHE		-Met-	-Ala-	-Val-	-Ser-		-Ser-Gly-	-Gln --- --- --- Lys-Ala ---		Ala-Lys (OH) 124

FIGURE 17 COMPARAISON DES SEQUENCES D'HISTONES H2A ETUDIEES AU LABORATOIRE
 Les délétions sont indiquées par ---

* L'histone H2A de l'érythrocyte de Siponcle renferme un résidu de méthionine en position 54 comme les histones homologues de gonades d'Etoile de mer (MARTINAGE et coll., 1983) et de Seiche (WOUTERS-TYROU et coll., 1982). Des variants de l'histone H2A isolées du thymus de Veau, de l'érythrocyte de Poulet (URBAN et coll., 1979), des cellules de leucémie de FRIEND (BLANKSTEIN et coll., 1977) et d'embryon d'Oursin (SCHAFFNER et coll., 1978) contiennent un résidu de méthionine en position 51.

Comme le révèle la figure 17 :

* Les positions 16 et 99 sont des sites privilégiés de substitution. Dans toutes les histones H2A d'Invertébrés marins (Oursin, Seiche, Etoile de mer, Siponcle) le remplacement d'un résidu de lysine en position 99 (H2A de thymus de Veau) par un résidu de glycine accroît de quatre résidus la longueur de la zone hydrophobe C-terminale (100-117, H2A de Veau ; 95-116, H2A de Siponcle).

* La séquence 78 à 97 qui renferme une séquence Asp-Glu-Glu-demeure invariable chez toutes les espèces étudiées : cela est sans doute lié aux contraintes imposées par les interactions avec l'histone H2B. Maurice COUPPEZ a montré que l'interaction des régions 18-118 de H2A avec la région 32-125 de H2B est en partie assurée par des liaisons ioniques car elle est détruite en milieu $\text{GuCl } 1\text{M}$ à pH 2.0 mais non à pH 6.8.

Les modifications post-synthétiques de l'histone H2A sont situées dans la région N-terminale (acétylation du résidu de lysine en position 5, phosphorylation de la sérine 1 (MARTINAGE et coll., 1980) ou dans les régions charnières entre la zone structurée et les extrémités basiques N- et C-terminales (Figure 2) (phosphorylation de la sérine 19, liaison de l'ubiquitine au résidu de lysine 119). L'histone H2A de l'érythrocyte de Siponcle est phosphorylée sur le résidu de N-acétyl-sérine N-terminal à un taux de 60%. GURLEY et WALTERS (1973), HALLECK et

GURLEY (1980) ont suggéré que la phosphorylation de l'histone H2A pourrait être reliée à la condensation de l'hétérochromatine. La phosphorylation de l'histone H2A de l'érythrocyte de Saponcle pourrait être liée à l'inactivation et à la condensation de la chromatine si l'on peut généraliser ce qui a été observé dans la chromatine de l'érythrocyte de Poulet par RUIZ-CARILLO et coll. (1976), dans laquelle l'histone H2A est la seule à être phosphorylée jusqu'aux derniers stades de la maturation érythrocytaire.

Plusieurs espèces animales et végétales renferment des variants de l'histone H2A : Veau, Rat, Souris (tissus normaux et cancéreux), Poulet, cellules Héla (BLANKSTEIN et coll., 1977, LAINE et coll., 1976). Trois variants sont présents dans le germe de blé (*Triticum aestivum*) (RODRIGUEZ et coll., 1979). Ils sont caractérisés par une extension de la séquence amino-terminale par comparaison avec la structure primaire d'une histone H2A d'origine animale. Une histone H2A allongée de 40 résidus du côté N-terminal a été caractérisée chez *Physarum polycephalum* (CHAMPAGNE et coll., 1982). La présence de ces variants d'histones introduit une hétérogénéité importante dans la structure nucléosomique. Certains nucléosomes pourraient ainsi faire l'objet d'une reconnaissance spécifique par les enzymes de la réplication et de la transcription. Dès lors ces variants d'histones (18 en général présents en faible quantité, excepté ceux apparentés à l'histone H1) ne se limiteraient plus à ordonner la structure de la chromatine mais seraient aussi impliqués dans son fonctionnement.

BIBLIOGRAPHIE

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 Leucemia. Biochemistry 16, 4557-4562.

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. and CRANE-ROBINSON, C. (1984)

Proteases as structural probes for chromatin : the domain structure of histones.

Biosciences Reports 4, 365-386.

BRADBURY, E.M., CARY, P.D., CRANE-ROBINSON, C., RATTLE, H.W.E., BOUBLIK, M. and SAUTIERE, P. (1975)

Conformations and interactions of histone H2A.

Biochemistry 14, 1876-1885.

CHAMPAGNE, M., DEMOUVEAU, M.F., COUPPEZ, M. and SAUTIERE, P. (1982)

The core histones of the slime mold *Physarum polycephalum*. Isolation and characterization.

Eur.J.Biochem. 126, 89-94.

GURLEY, L.R. and WALTERS, R.A. (1973)

Evidence from Triton X-100 polyacrylamide gel electrophoresis that histone F2a2, not F2b is phosphorylated in Chinese Hamster cells.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 55, 697-703.

HALLECK, M.S. and GURLEY, L.R. (1980)

Histone H2A subfractions and their phosphorylation in cultured *Peromyscus* cells.

Exp.Cell.Res. 125, 377-388.

LAINE, B., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1976)

Primary structure and microheterogeneities of Rat chloroleukemia histone H2A (Histone ALK, IIb1 or F2a2).

Biochemistry 15, 1640-1645.

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

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

FEBS Letters 118, 323-329.

- MARTINAGE, A., BELAÏCHE, D., DUPRESSOIR, T. and SAUTIERE, P. (1983)
Primary structure of histone H2A from gonads of the
starfish *Asterias rubens*.
Eur.J.Biochem. 130, 465-472.
- MOSS, T., CARY, P.D., ABERCROMBIE, B.D., CRANE-ROBINSON, C. and
BRADBURY, E. (1976)
A pH-dependent interaction between histones H2A and H2B
involving secondary and tertiary folding.
Eur.J.Biochem. 71, 337-350.
- RODRIGUEZ, J. DE A., BRANDT, N.F. and VAN HOLT, C. (1979)
Plant histone 2 from wheatgerm, a family of histone H2A
variants.
Biochim.Biophys.Acta 578, 196-206.
- RUIZ-CARILLO, A., WANGH, L.T. and ALLFREY, V.G. (1976)
Selective synthesis and modification of nuclear proteins
during maturation of avian erythroid cells.
Arch.Biochem.Biophys. 174, 273-290.
- SCHAFFNER, W., KUNZ, G., DAETWYLER, H., TELFORD, J., SMITH, H.O.
and BIRNSTIEL, M.L. (1978)
Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA
analysed by sequencing.
Cell 14, 655-671.
- URBAN, M.K., FRANKLIN, S.G. and ZWEIDLER, A. (1979)
Isolation and characterization of the histone variants
in chicken erythrocytes.
Biochemistry 18, 3952-3960.
- WOUTERS-TYROU, D., MARTIN-PONTHIEU, A., BRIAND, G., SAUTIERE, P.
and BISERTE, G. (1982)
The amino acid sequence of histone H2A from the Cuttle
fish *Sepia officinalis*.
Eur.J.Biochem. 124, 489-498.

II - 2 CARACTÉRISATION DES PROTÉINES BASIQUES : HISTONES ET
PROTAMINES DU SPERME DE *PLATYNEREIS DUMERILII*

CHARACTERIZATION OF THE HISTONES AND PROTAMINES FROM THE SPERM OF THE MARINE WORM *PLATYNEREIS DUMERILII*

DANIEL SELLOS* and DANIEL KMIÉCIK†

*Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France, BP 11, 29110 Concarneau, France and †Unité
409 du CNRS, et Institut de Recherches sur le Cancer, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

(Received 1 March 1984)

Abstract—1. The basic proteins, histones and protamines, from the emitted sperm of the annelid *Platynereis dumerilii* have been isolated and characterized.

2. The somatic core histones are maintained in the chromatin of *Platynereis spermatozoa*.

3. Four specific histones H1 have been identified. Two closely related proteins of them are characterized by their low M_r ($\approx 13,000$) and constitute 80% of 5% PCA soluble material.

4. Besides a histone complement, the sperm chromatin of *Platynereis* encloses two closely related protamines of M_r 7000 which contain 50% of arginine and represent 15% of the total basic proteins of this chromatin.

5. *Platynereis dumerilii* sperm cells can be used as a model system for understanding the compaction of chromatin in case of coexistence of particular histones H1 and protamines.

INTRODUCTION

A great variability has been found in the proteins associated with the DNA in spermatozoa. Typical protamines have been isolated from the sperm of fishes (Vendrelli *et al.*, 1965; Ando *et al.*, 1973; Sautière *et al.*, 1981), birds (Nakano *et al.*, 1976), mammals (Calvin, 1976; Kistler *et al.*, 1976; Montfoort *et al.*, 1973), insect (McMaster-Kaye and Kaye, 1976) and it seemed that they are present in amphibians and reptiles too (Kasinsky *et al.*, 1978). On the other hand, histones have also been found in the chromatin of spermatozoa in some fishes (Subirana *et al.*, 1975; Munoz-Guerra *et al.*, 1982) and batrachians (Alder and Gorosky, 1975). In crustaceans (Sellos and Le Gal, 1981) and echinoderms (Palau *et al.*, 1969; Van Houtte-Durand *et al.*, 1977), histones and histone-like proteins are found. In molluscs, different basic proteins have been observed (Subirana *et al.*, 1973; Subirana, 1975; Colom and Subirana, 1979).

Little information has been obtained on marine invertebrates and in particular on annelids. The maintenance of histones in the chromatin of the invertebrate sperm cell and the presence of additional histones or protamines give us information on the mechanism of condensation of the DNA in this nucleus with compact chromatin.

MATERIALS AND METHODS

Collection of animals

Marine annelids were fished at the "Station Biologique d'Arcachon" (France) at the beginning of July. Male worms were placed in a bucket and the emission of sperm was obtained by thermic shock in the presence of a few females.

Preparation of sperm nuclei

All subsequent operations were carried out at 4°C. Sperm was separated from worms by filtration through Nylon cloth 300 μm pore size (Durieux, France). After addition of 2 ml of $i\text{Pr}_2\text{PF}$ (1% in propane-2-ol, w/v) per liter of sperm, the sperm cells were collected by centrifugation at 4000 g for 15 min. The supernatant mostly consisting of coelomic fluid was discarded.

The sperm cells were washed twice in 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6 containing 0.35 M NaCl and 0.1 mM $i\text{Pr}_2\text{PF}$ (buffer A). Sperm cells were then homogenized in buffer A containing 1.1 M sucrose and 0.5% Triton X-100. Pure nuclei were obtained in the pellet by centrifugation of the homogenate applied onto two superposed layers of 1.1 and 2.2 M sucrose respectively in buffer A containing 0.5% Triton X-100, at 32,000 g for 90 min in a SW-25-1 rotor (Beckman Spinco). Flagella were gathered at the top and pure nuclei at the bottom of the 2.2 M sucrose layer.

Preparation of chromatin

Chromatin was prepared either from purified nuclei or from sperm cells. Sperm cells or nuclei were resuspended in buffer A (containing 0.1 mM $i\text{Pr}_2\text{PF}$) and homogenized in a Sorvall Omni-Mixer (three times at 200 V for 2 sec and once at 120 V for 20 sec).

Chromatin was pelleted at 2000 g for 30 min and the yellow supernatant was discarded. The pellet of chromatin was washed once with absolute ethanol before extraction of basic proteins. The preparation of chromatin directly from sperm cells had no noticeable effect on the quality of histone preparations.

Extraction of basic proteins

The chromatin pellet was resuspended in 0.25 M HCl and basic proteins were extracted by stirring at 4°C for 2 hr. The mixture was then centrifuged 15 min at 8000 g and the proteins were precipitated from the supernatant with nine volumes of acetone at -20°C during 78 hr. The protein precipitate was recovered by centrifugation at 8000 g for 15 min and washed with cold acetone and finally dried under vacuum.

Approximately 840 mg of total basic proteins were recovered from 300 ml of sperm cells provided by 10,000 worms.

Abbreviations: $i\text{Pr}_2\text{PF}$, diisopropylfluorophosphate; dansyl-5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl.

Preparation of histones and protamines

Fractionation of 5% HClO₄ soluble basic proteins. Five hundred milligrams of total basic proteins were dissolved in 100 ml of 0.01 M HCl. The solution was made 5% (w/v) in perchloric acid and left for 1 hr. The precipitated material was recovered by centrifugation at 17,000 g for 15 min. The lysine-rich histones were precipitated from the supernatant by addition of trichloroacetic acid up to a final concentration of 18% (w/v) and recovered by centrifugation at 17,000 g for 15 min. The pellet of lysine-rich histones was then dissolved in 0.01 M HCl, dialysed against 0.01 M HCl and lyophilized. Thirty milligrams of lysine-rich histones were dissolved in 2 ml of 6 M guanidinium chloride 1 M 2-mercaptoethanol in 5 mM Tris-HCl pH 7.6, kept at 20°C during 24 hr, and applied to a Biogel P-100 column (2.6 × 150 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

Fractionation of 5% HClO₄ insoluble basic proteins. The material precipitated in 5% perchloric acid was dissolved in 0.01 M HCl, dialysed against 0.01 M HCl and lyophilized. One hundred milligrams of this material were dissolved in 2.5 ml of 6 M guanidinium-HCl, 1 M 2-mercaptoethanol in 5 mM Tris-HCl pH 7.6 kept at 20°C during 24 hr, before application to a Biogel P-10 column (2.6 × 150 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Further purifications of histone fractions separated on Biogel P-10 and P-100 were achieved through gel filtration chromatography on Sephadex G-100 column (2.6 × 150 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

Purification of protamines. The protamine fraction obtained from the Biogel P-10 chromatography was heterogeneous and purified on a column of CM-Cellulose (Whatman CM-52) (2 × 37 cm) equilibrated with 0.2 M NaCl in 0.02 M ammonium acetate/acetic acid pH 5.0. The proteins were dissolved in the same buffer (Watson *et al.*, 1979; Ausio and Subirana, 1982) and applied to the column. The column was eluted with a linear gradient from 0.2 to 1.7 M NaCl in the acetate buffer. Subfractionation of the protamine fraction obtained from the CM-cellulose column was achieved

through high pressure liquid chromatography on a C₁₈ μ Bondapak column (4.6 × 250 mm) (Waters Associates) equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid in water (w/v). The column was eluted with a linear gradient of acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid ranging from 0 to 50%.

Analytical electrophoresis

Histone and protamine fractions were subjected to electrophoresis on polyacrylamide slab gels (16 × 16 cm) at 22 mA for 5 hr at pH 3.2 in 2.5 M urea (Panyim and Chalkley, 1969). Slabs were stained overnight with 0.1% Amido black in acetic acid/methanol/water (7:20:73, by vol) and destained by diffusion in the mixture acetic acid/methanol/water (7:20:73, by vol).

Amino acid analyses

Histone and protamine samples were hydrolysed in 6 M HCl at 110°C for 24 and 72 hr *in vacuo* in the presence of one drop of 1% phenol in order to prevent hydrolytic loss of tyrosine. Amino acid analyses were performed with a Beckman Multichrom A amino acid analyser.

Amino-terminal end group analysis

Dansylation of the histones and protamines were performed according to Gray (1972) followed by hydrolysis of the labelled proteins for 16 hr with HCl 6 M. Dansylamino acids were identified by thin layer chromatography on polyamide sheets (Doolittle, 1977).

RESULTS

Biogel P-100 chromatography of 5% perchloric acid-soluble proteins from sperm cells of *Platynereis dumerillii* yielded three fractions (Fig. 1A). In acetic-urea gel electrophoresis, fraction 1 appears homogeneous and has an intermediate mobility between the histone H1 and the histone H3 from calf thymus (Fig. 1B, slot 5). Fraction 2 shows two electro-

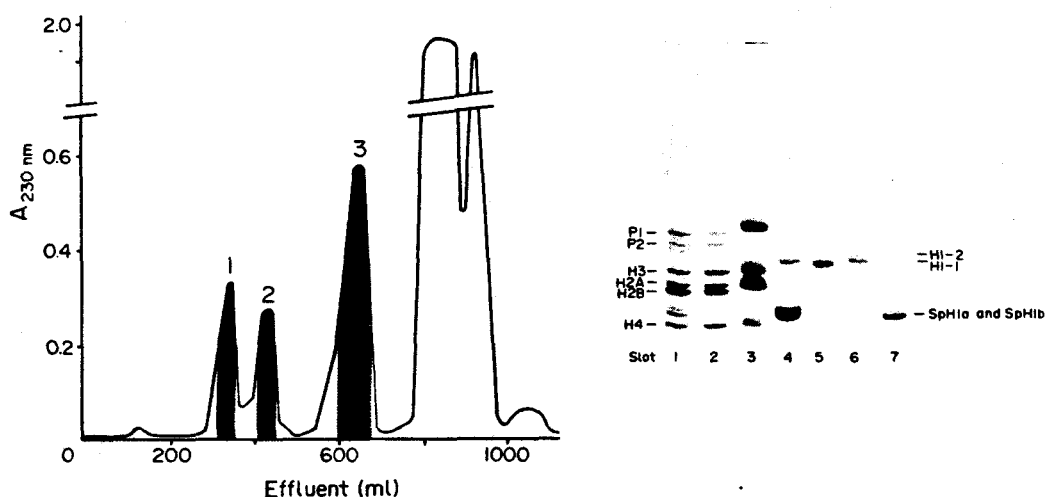


Fig. 1. (A) Biogel P-100 chromatography of 5% HClO₄ soluble proteins from *Platynereis dumerillii* sperm cells. Fractions of 3.5 ml were collected at a flow rate of 7 ml/hr. (B) polyacrylamide gel electrophoresis of 5% HClO₄ soluble proteins from *Platynereis dumerillii* sperm cells. Migration was from top to bottom. Slot 1: *Platynereis dumerillii* whole basic protein. Slot 2: *Platynereis dumerillii* 5% HClO₄ insoluble proteins. Slot 3: Calf thymus whole histone. Slot 4: *Platynereis dumerillii* 5% HClO₄ soluble proteins. Slot 5: Fraction 1 of Fig. 1(A). Slot 6: Fraction 2 of Fig. 1(A). Slot 7: Fraction 3 of Fig. 1(A).

Table 1. Amino acid compositions of 5% HClO₄ soluble proteins from the sperm cells of *Platynereis dumerilii*

Amino acid	H1-1 from annelid sperm	H1-2 from annelid sperm	Specific H1 from annelid sperm		H1 from calf thymus	H1 from sea urchin (Strickland <i>et al.</i> , 1980)	H5 from chicken erythrocyte (Briand <i>et al.</i> , 1980)
			SpH1-a	SpH1-b			
Asp	5.9	6.6	6.6	7.6	2.4	1.6	1.8
Thr	6.1	6.0	6.3	5.8	3.8	2.0	3.3
Ser	10.4	11.5	5.6	4.8	5.7	7.7	13
Glu	7.0	7.2	2.3	2.4	3.8	2.0	4.4
Pro	9.7	9.9	6.4	5.9	10.4	8.1	7.1
Gly	6.6	6.4	5.3	5.2	7.1	4.0	4.8
Ala	11.7	10.8	17.3	16.6	26.4	25.4	15.8
Cys	0.4	0.6	—	—	—	—	—
Val	4.2	4.3	7.1	6.8	4.2	3.6	3.9
Met	1.3	1.7	0.3	0.9	—	1.6	0.6
Ile	3.6	3.5	3.1	3.1	0.9	0.8	3.0
Leu	4.9	5.6	4.0	3.9	4.2	2.0	4.6
Tyr	2.0	2.5	1.1	1.5	0.5	0.8	1.7
Phe	2.3	2.3	2.1	2.2	0.5	0.4	0.6
Lys	15.9	11.8	24.6	23.4	28.8	28.6	24.1
His	0.9	0.7	0.9	0.9	—	0.8	1.4
Arg	7.1	8.6	9.0	8.8	1.4	10.5	10.9
Lys/Arg	2.24	1.37	2.68	—	20.6	2.7	2.20
Basic/acidic	1.84	1.53	4.92	—	4.9	11.0	5.90
N-terminus	Blocked	Blocked	Ala	—	Blocked	Pro	Thr

*mol/100 mol.

Amino acid compositions of calf thymus histone H1, sea urchin sperm H1 and chicken erythrocyte histone H5 are given for comparison. All results are expressed in molecules per cent molecules of amino acid. Values for threonine and serine in the proteins are zero-time extrapolations.

phoretic bands with a slightly lower mobility than fraction 1 (Fig. 1B, slot 6).

Fractions 1 and 2 have similar amino acid compositions characterized by high amounts of lysine, alanine, serine and proline (Table 1). These four amino acids represent together about 46% of the total amino acids found in each fraction.

Fraction 3 (Fig. 1B, slot 7) shows also two components with an intermediate mobility between that of calf histone H2B and that of calf histone H4. These

two components represent together in weight approximately 80% of the proteins extracted with 5% perchloric acid. The separation of these two components, which were shown to be two variants SpH1-a and SpH1-b of a sperm specific protein, was achieved by sulfopropyl-Sephadex chromatography as described by Champagne *et al.* (1982). Both are characterized by high amounts of lysine, alanine and arginine which represent about 26, 18 and 10% respectively (Table 1).

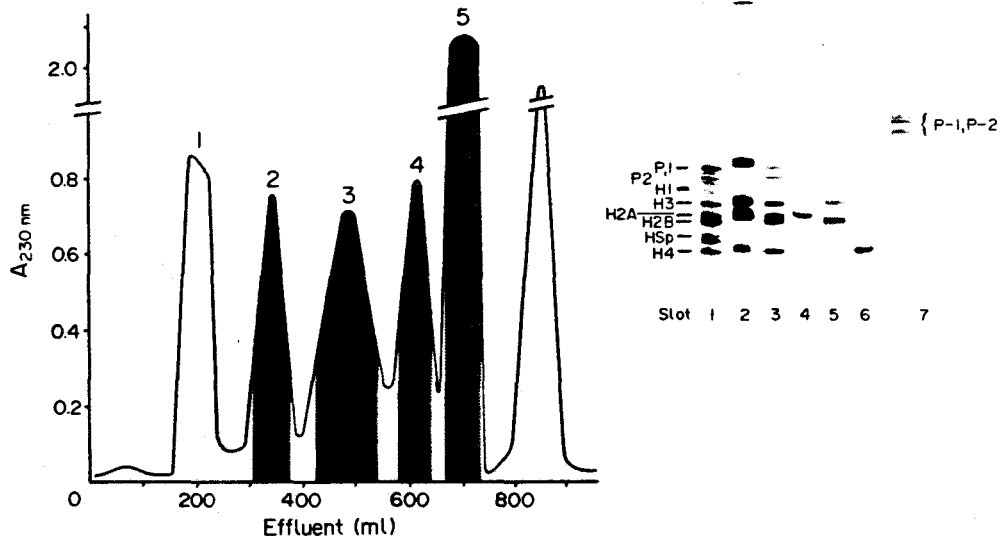


Fig. 2. (A) Biogel P-10 chromatography of 5% HClO₄ insoluble proteins from *Platynereis dumerilii* sperm cells. Fractions of 3.5 ml were collected at a flow rate of 7 ml/hr. (B) Polyacrylamide gel electrophoresis of 5% HClO₄ insoluble proteins from *Platynereis dumerilii* sperm cells. Migration was from top to bottom. Slot 1: *Platynereis dumerilii* whole basic protein. Slot 2: Calf thymus whole histone. Slot 3: *Platynereis dumerilii* 5% HClO₄ insoluble proteins. Slots 4, 5, 6 and 7. correspond to fractions 2, 3, 4 and 5 respectively from Fig. 2(A).

Table 2. Amino acid compositions of core-histones from the sperm cells of *Platynereis dumerilii*

Amino acid	H2A		H2B		H3		H4	
	Annelid sperm	Calf	Annelid sperm	Calf	Annelid sperm	Calf	Annelid sperm	Calf
Asp	6.8	6.9	5.3	4.8	4.6	3.7	5.1	4.9
Thr	4.0	3.8	6.4	6.4	7.5	7.4	7.1	6.9
Ser	5.6	3.0	8.9	11.2	6.7	3.7	3.4	2.0
Glu	8.9	9.2	9.0	8.0	10.2	11.1	6.7	5.9
Pro	4.2	3.8	4.1	4.8	6.2	4.4	1.6	1.0
Gly	10.1	10.7	6.7	5.6	5.6	5.2	14.9	16.7
Ala	11.9	13.0	10.6	10.4	11.5	13.3	7.4	6.9
Cys	0	0	0	0	0.9†	1.5	0	0
Val	5.8	6.1	5.4	7.2	4.9	4.4	7.5	8.8
Met	1.0	0	1.2	1.6	1.8	1.5	1.3	1.0
Ile	5.0	4.6	5.2	4.8	4.9	5.2	5.6	5.9
Leu	10.6	12.2	6.7	4.8	7.7	8.9	7.8	7.8
Tyr	2.7	2.3	3.1	4.0	2.3	2.2	3.8	3.9
Phe	1.4	0.8	2.3	1.6	2.5	3.0	2.1	2.0
His	1.8	3.0	1.9	2.4	1.2	1.5	1.9	2.0
Lys	11.1	11.5	11.5	16.0	9.3	9.6	10.2	10.8
Arg	9.1	9.2	11.7	6.4	13.0	13.3	13.6	13.7
Lys/Arg	1.22	1.25	0.98	2.5	0.71	0.7	0.71	0.79
Basic/acidic	1.39	1.5	1.76	1.9	1.59	1.65	2.03	2.45
N-terminus	blocked	blocked	Pro	Pro	Ala	Ala	blocked	blocked

*Mol/100 mol.

†Determined as cysteic acid.

Amino acid compositions of calf thymus core-histones are given for reference. All results are expressed in molecules per cent molecules of amino acids. Values for threonine and serine in the proteins are zero-time extrapolations.

Biogel P-10 chromatography of 5% perchloric acid-insoluble material from the sperm cells of the annelid *Platynereis dumerilii* yielded five fractions (Fig. 2A). The analytical gel electrophoresis of these fractions is shown in Fig. 2(B).

Fraction 1 mostly of aggregated material was not studied further.

Fraction 2 (slot 4) appears homogeneous and corresponds to histone H2A as evidenced by amino acid analysis (Table 2). Histone H2A is indeed characterized by high amounts of glycine, alanine and leucine, a leucine to isoleucine ratio larger than 2, and a lysine to arginine ratio close to 1.2. By comparison with calf homologous histone, *Platynereis* H2A is

characterized by increased amounts of serine and phenylalanine, the presence of methionine and a decreased amount of histidine corresponding likely to the deletion of the two histidine residues of the C-terminal end of the protein as observed in invertebrate H2A (Wouters-Tyrou *et al.*, 1978, 1982; Martinage *et al.*, 1983; Kmićik *et al.*, 1983). The decrease of leucine could be related to the presence of methionine and phenylalanine, since in histone H2A from echinoderms leucine at positions 32 and 54 is replaced by phenylalanine and methionine respectively.

Fraction 3 (slot 5) contains histones H3 and H2B as major components and a slight amount of histone

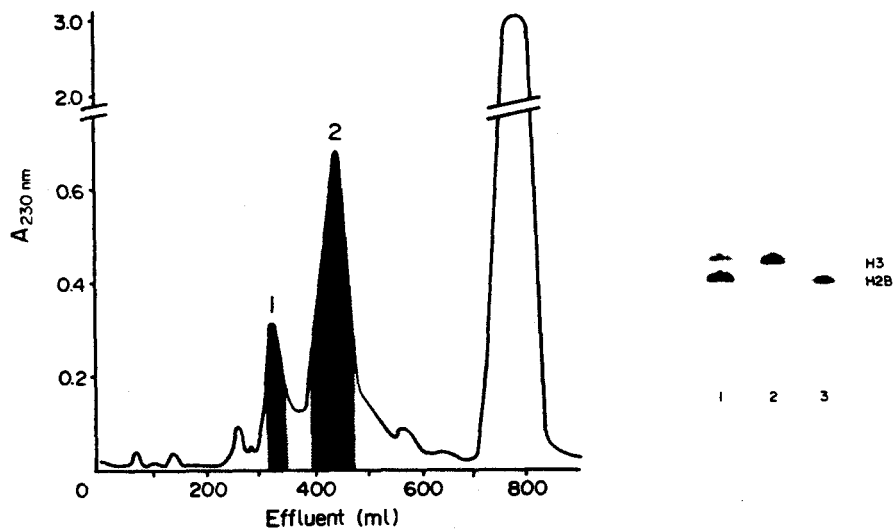


Fig. 3. (A) Sephadex G-100 chromatography of fraction 3 from Fig. 2(A) eluted with HCl 0.01 M. Fractions of 3.5 ml were collected at a flow rate of 7.5 ml. (B) Polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions from the Sephadex G-100 chromatography. Slot 1: Crude fraction 3 from Fig. 2(A). Slot 2: Fraction 1 from Fig. 3(A). Slot 3: Fraction 2 from Fig. 3(A).

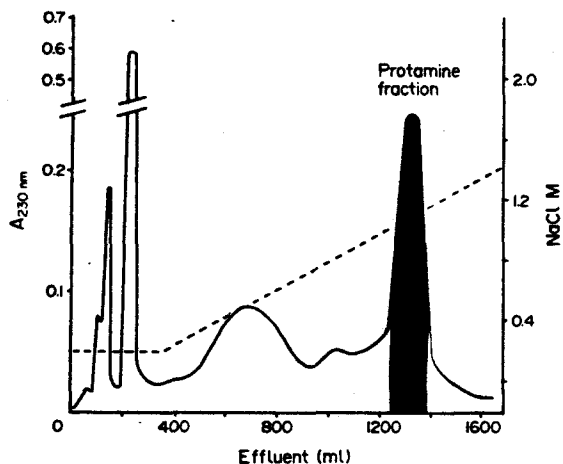


Fig. 4. CM-Cellulose ion-exchange chromatography of fraction 5 from Fig. 2(A). A Whatman CM-52 column (2 x 37 cm) is equilibrated with 0.2 M NaCl in 0.02 M ammonium acetate/acetic acid pH 5.0. Proteins from fraction 5 of Fig. 2(A) are dissolved in the same buffer and applied to the column. The column is then eluted with a linear gradient of 0.2 to 1.7 M NaCl in 0.02 M ammonium acetate/acetic pH 5.0 buffer at a flow rate of 120 ml/hr. Fractions of 10 ml are collected.

H4. This fraction was further submitted to gel filtration chromatography on Sephadex G-100 (Fig. 3A) to yield pure histones H2B and H3 as evidenced by analytical electrophoresis (Fig. 3B, slots 2, 3) and

amino acid analysis (Table 2). The main feature of *Platynereis* H2B is a lysine to arginine ratio equal to 1 approximately. By comparison with calf H2B, the decrease of lysine is balanced by an increase of arginine.

Fraction 4 (slot 6) corresponds to pure histone H4 (Table 2). The comparison of the amino acid compositions of *Platynereis* histones H3 and H4 with their calf counterparts shows no significant differences except that the amounts of serine and proline are higher in the *Platynereis* histones. The larger amount of serine in *Platynereis* H3 is balanced by lower amounts of alanine and cysteine, as observed in known sequences of plant and animal H3.

Fraction 5 (slot 7) appears highly heterogeneous and mainly constituted of slow moving components. Partial purification of these components was obtained by chromatography on CM-Cellulose (Fig. 4). The last fraction eluted from CM-Cellulose at approximately 1 M NaCl was further fractionated by reverse phase liquid chromatography and resolved into two subfractions called P-1 and P-2 (Fig. 5A). P-1 and P-2 appear heterogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 5B, slots 5 and 6). No further attempt was made to purify to homogeneity these two subfractions. Their amino acid compositions presented in Table 3 are characterized by high contents of arginine, serine and alanine and the lack of aromatic residues. The amount of arginine ranges between 43% for P-1 and 50% for P-2. These data strongly suggest that P-1 and P-2 are two closely

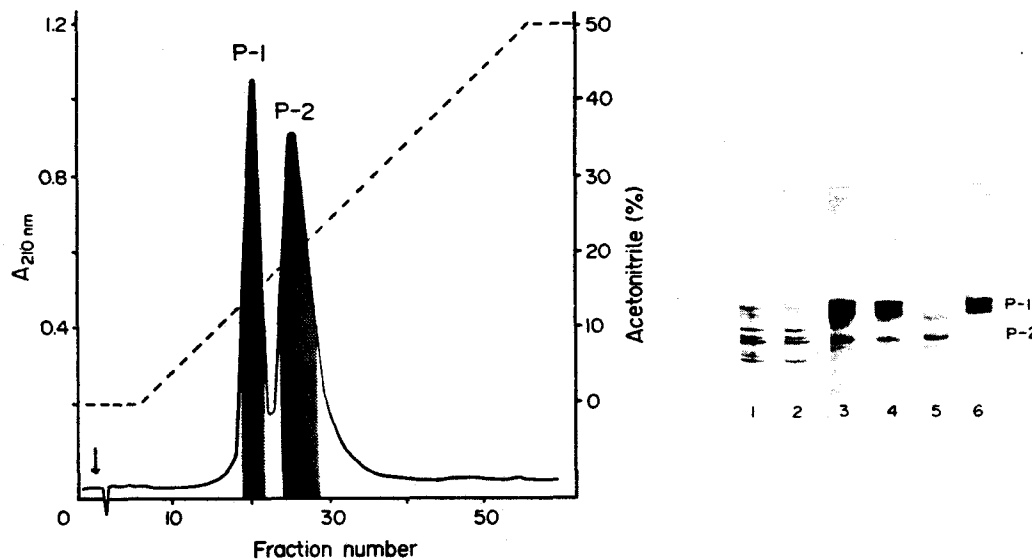


Fig. 5. (A) Reversed phase high pressure liquid chromatography of the protamine sample from Fig. 4. Protamines are dissolved in 0.05% trifluoroacetic acid and applied to a column of C_{18} Bondapak (0.39 x 30 cm) equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid. The column was eluted with a linear gradient (----) from 0. to 50% acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid. Fractions of 1.2 ml were collected at a flow rate of 2 ml/min. The elution of protamines was monitored at 210 nm. (B) Gel electrophoresis of the different purification steps of the protamine fractions. Migration was from top to bottom. Slot 1: Whole histone from *Platynereis* sperm cells. Slot 2: 5% $HClO_4$ insoluble proteins from *Platynereis* sperm cells. Slot 3: Fraction 5 from Fig. 2(A). Slot 4: Fraction of protamine eluted at 1.07 M NaCl from the CM-Cellulose (Fig. 4). Slot 5: Fraction P-1 from Fig. 5(A). Slot 6: Fraction P-2 from Fig. 5(A).

Table 3. Amino acid compositions of *Platynereis dumerilii* sperm protamines p-1 and P-2.

Amino acid	P-1 protamine	P-2 protamine
Asp	3*	2.6
Thr	3.7	3.3
Ser	23.8	20.1
Gly	4.7	4.5
Ala	12.6	12.3
Val	1.6	1.4
Leu	1.7	1.5
Lys	5.5	4.6
Arg	43.4	49.7
N-terminus	Thr	Thr
C-terminus	Arg	Arg

*mol/100 mol. All results are expressed in molecules per cent molecules of amino acids. Values for threonine and serine in the proteins are zero-time extrapolations.

related families of protamine molecules. The apparent heterogeneity of P-1 and P-2 on polyacrylamide gel electrophoresis could be attributed to the presence of structural variants or/and to the presence of post synthetic modifications which remain to be determined. However digestion of P-1 and P-2 with alkaline phosphatase does not modify the electrophoretic mobility of these components (gels not shown). Moreover no phospho-amino acids (threonine and serine) were identified after two hour hydrolyses of P-1 and P-2 with 6 M HCl.

DISCUSSION

Platynereis histones H3 and H4 do not exhibit any significant differences with their calf counterparts. However *Platynereis* H3 contains a higher amount of serine and a lower amount of alanine and only one residue of cysteine by comparison with calf H3. If we refer to the known sequences of animal and plant histones H3, the residue of cysteine at position 96 is probably replaced by a residue of serine as observed in mouse, chicken, fish, echinoderm and pea H3 (Von Holt *et al.*, 1979).

Platynereis histones H2A and H2B appear more variable with regard to calf homologous histones.

Platynereis H2A is characterized by the presence of methionine, a higher amount of serine and phenylalanine and a lower amount of leucine and histidine. Most of these features are typical of histones H2A from invertebrates (Subirana *et al.*, 1973; Wouters-Tyrou *et al.*, 1978, 1982; Strickland *et al.*, 1980; Martinage *et al.*, 1983; Kmićik *et al.*, 1983). The lower amount of leucine is related to the higher amount of phenylalanine and to the presence of methionine as found in echinoderm H2As (Wouters-Tyrou *et al.*, 1978; Von Holt *et al.*, 1979; Martinage *et al.*, 1983). The amount of histidine in *Platynereis* H2A is about half of that in calf H2A and reflects probably the deletion of two histidine residues in the C-terminal region of the protein as observed in fish and invertebrate H2A (Bailey and Dixon, 1973; Wouters-Tyrou *et al.*, 1978, 1982; Martinage *et al.*, 1983; Kmićik *et al.*, 1983).

Platynereis H2B is essentially characterized by a lysine to arginine ratio of ≈ 1 . The low value of this ratio by comparison with that of bovine H2B (Lys/Arg = 2.5) is a result of a decrease of the lysine amount which occurs concomitantly with an increase of the arginine amount. This ratio of 1 is intermediate

between that found in H2B from sperm of sea urchin *Parechinus angulosus* (Strickland *et al.*, 1978) close to 0.6 and those found in H2B from sperm of sea cucumber *Holothuria tubulosa* (Phelan *et al.*, 1972) close to 1.6, in H2B from sperm of starfish *Marthasterias glacialis* (Strickland *et al.*, 1980a) close to 1.7 and in H2B from gonads of a mollusc *Patella granatina* (Van Helden *et al.*, 1979) close to 1.8. This feature is not specific to the sperm H2Bs, since in H2B from sipunculid erythrocyte the lysine to arginine ratio is 1.2 (Mazen *et al.*, 1978). On the other hand, only one type of H2B molecule seems to be present in *Platynereis* sperm chromatin whereas in sea urchin sperm chromatin three H2B variants have been identified (Strickland *et al.*, 1978). Concerning the hydrophobic residues of *Platynereis* H2B the decrease of the amount of valine is balanced by an increase of the amount of leucine.

Platynereis sperm chromatin does not contain typical histones H1, but rather a set of four specific proteins soluble in 5% PCA which differ from the somatic H1, by the molecular size and the amounts of serine, alanine, lysine and arginine essentially.

Eighty percent of these specific proteins are constituted of two closely related proteins of $M_r \approx 13,000$ called SpH1-a and SpH1-b which contain about 24% of lysine, 17% of alanine and 9% of arginine and present some structural relationships together with H1 from sperm of *Parechinus angulosus* (Strickland *et al.*, 1980b) and with chicken erythrocyte H5 (Briand *et al.*, 1980) as shown in Table 1.

The minor constituents H1-1 and H1-2 ($M_r \approx 19,000$) of the 5% PCA soluble fraction of *Platynereis* sperm chromatin contain about 11% of serine, 10% of proline, 11% of alanine, 7 to 8% of arginine and differ only from each other by the amount of lysine (16% for H1-1 and 12% for H1-2).

Besides a histone complement similar to that found in somatic tissues of higher eukaryotes, the sperm chromatin of *Platynereis* contains two basic polypeptides P-1 and P-2 of $m_r \approx 7000$ which represent 15% of the total basic proteins present in this chromatin. Arginine, serine and alanine are the most abundant amino acids constitutive of the polypeptides and represent together about 80% of the total amino acids. Moreover, P-1 and P-2 are devoid of glutamic acid, cysteine, isoleucine and aromatic amino acids. These features are typical of most of the marine invertebrate sperm protamines (Subirana *et al.*, 1973; Balhorn *et al.*, 1979; De Petrocellis *et al.*, 1983).

The presence of nucleosomal histones together with protamines in the sperm chromatin of *Platynereis dumerilii* which belongs to the unfixed Polychaete annelids does not fit with the results of De Petrocellis *et al.* (1983), who have found that the sperm chromatin of the sedentary polychaete annelid, *Chaetopterus variopedatus*, contains only a histone H1 and a protamine. The amino acid composition of this protamine is very similar to that of P-1 or P-2 except that the amount of lysine is roughly three times higher in the protamine of *Chaetopterus variopedatus*.

Acknowledgements—The authors thank Dr. Pierre Sautière for critical reading of the manuscript. They acknowledge

with pleasure the skilful technical assistance of M. J. Dupire and A. Hémez and they are grateful to M. Blanquet for editorial assistance.

REFERENCES

- Alder D. and Gorosky M. A. (1975) Electrophoretic analysis of liver and testis histones of the frog *Rana pipiens*. *J. Cell Biol.* **64**, 389–397.
- Ando T., Yamasaki M. and Suzuki M. (1973) Isolation, characterization, structure and function. *Protamines* (Edited by A. Kleinzeller), Vol. 12, pp. 1–115. Springer, Berlin.
- Ausio J. and Subirana J. A. (1982) A high molecular weight nuclear basic protein from the bivalve mollusc *Spisula solidissima*. *J. Biol. Chem.* **257**, 2802–2805.
- Bailey G. S. and Dixon G. H. (1973) Histone II-bl from rainbow trout. Comparison in amino acid sequence with calf thymus II-Bl. *J. Biol. Chem.* **248**, 5463–5472.
- Balhorn R., Lake S. and Gledhill B. L. (1979) Electrophoretic analysis of nuclear proteins isolated from sperm of the black abalone *Haliotis crakeroidii*. *Expl. Cell Res.* **123**, 414–417.
- Briand G., Kmićek D., Sautière P., Wouters D., Borie-Loy O., Biserte G., Mazon A. and Champagne M. (1980) Chicken erythrocyte histone H5. IV—Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence. *FEBS Lett.* **112**, 147–151.
- Calvin H. I. (1976) Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim. biophys. Acta* **434**, 377–389.
- Champagne M., Demouveau M. F., Couppez M. and Sautière P. (1982) The core-histones from the slime mold *Physarum polycephalum* isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.* **126**, 89–94.
- Colom J. and Subirana J. A. (1979) Protamines and related proteins from spermatozoa of mollusc. Characterization and molecular weight determination by gel electrophoresis. *Biochim. biophys. Acta* **581**, 217–227.
- De Petrocellis B., Parente A., Tomei L. and Geraci G. (1983) An H1 histone and a protamine molecule organize the sperm chromatin of the marine worm *Chaetopterus variopedatus*. *Cell Differentiation* **12**, 129–135.
- Doolittle R. F. (1977) Sequencing peptides and proteins lacking free α -amino groups. *Advanced Methods in Protein Sequence Determination* (Edited by S. B. Needleman), pp. 38–54. Springer, Berlin.
- Gray W. F. (1972) End-group analysis using dansyl chloride. *Meth. Enzymol.* **25**, 121–138.
- Kasinsky H. E., Huang S. Y., Kwank S., Mann M., Sweeney M. A. J. and Yee B. (1978) On diversity of sperm histones in the invertebrates. III—Electrophoretic variability of testis specific histone patterns in *Anura* contrast. *J. exp. Zool.* **203**, 109–126.
- Kistler W. S., Keim P. S. and Heinrikson R. L. (1976) Partial structural analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa. *Biochim. biophys. Acta* **427**, 752–757.
- Kmićek D., Couppez M., Bélaiche D. and Sautière P. (1983) Primary structure of histone H2A from nucleated erythrocyte of the marine worm *Sipunculus nudus*. Presence of two forms of H2A in the sipunculid chromatin. *Eur. J. Biochem.* **135**, 113–121.
- McMaster-Kaye R. and Kaye J. S. (1976) Basic protein changes during the final stages of sperm maturation in the house cricket. *Expl. Cell Res.* **97**, 378–386.
- Martinage A., Bélaiche D., Dupressoir T. and Sautière P. (1983) Primary structure of histone H2A from gonads of the starfish *Asterias rubens*. *Eur. J. Biochem.* **130**, 465–472.
- Mazon A., Champagne M., Wilhelm M. and Wilhelm F. X. (1978) The structure of *Sipunculus nudus* erythrocyte chromatin. *Expl. Cell Res.* **117**, 431–438.
- Montfoort C. H., Schiphof R., Rozijn R. H. and Steyn-Parve E. P. (1973) Amino acid composition and carboxy-terminal structure of some basic chromosomal proteins of mammalian spermatozoa. *Biochim. biophys. Acta* **322**, 173–177.
- Munoz-Guerra S., Azorin F., Casas M. T., Marcet X., Maristany M. A., Roca J. and Subirana J. A. (1982) Structural organization of sperm chromatin from the fish *Carassius auratus*. *Expl. Cell Res.* **137**, 47–53.
- Nakano M., Tobita T. and Ando T. (1976) Studies on a protamine (galline from fowl sperm). III—The total amino acid sequence of intact galline molecule. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **8**, 565–578.
- Palau J., Ruiz-Carillo A. and Subirana J. A. (1969) Histones from sperm of the sea urchin *Arbacia lixula*. *Eur. J. Biochem.* **7**, 209–213.
- Pallota D. and Tessier A. (1976) Amino acid compositions of sperm histones in the house cricket *Acheta domesticus*. *Can. J. Biochem.* **54**, 56–61.
- Panyim S. and Chalkey R. (1969) The heterogeneity of histones. I—A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Biochemistry* **8**, 3970–3979.
- Phelan J. J., Subirana J. A. and Cole R. D. (1972) An unusual group of lysine-rich histones from gonads of a sea cucumber *Holothuria tubulosa*. *Eur. J. Biochem.* **31**, 63–68.
- Sautière P., Briand G., Gusse M. and Chevaillier Ph. (1981) Primary structure of a protamine isolated from the sperm nuclei on the dog-fish *Scylliorhinus caniculus*. *Eur. J. Biochem.* **119**, 251–255.
- Sellos D. and Le Gal Y. (1981) Changes in basic nuclear proteins during sperm maturation in *Palaemo serratus* (Crustacea Natancia). *Cell Differentiation* **10**, 69–77.
- Strickland M., Strickland W. N., Brandt W. F., Von Holt C., Wittman-Liebold B. and Lehmann A. (1978) The complete amino acid sequence of histone H2B from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. *Eur. J. Biochem.* **89**, 443–452.
- Strickland W. N., Strickland M., Brandt W. F., Von Holt C., Lehmann A. and Wittman-Liebold B. (1980a) The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. *Eur. J. Biochem.* **104**, 567–578.
- Strickland M. S., Strickland W. N. and Von Holt C. (1980b) The histone H2B from the sperm cell of the starfish *Marthasterias glacialis*. *Eur. J. Biochem.* **106**, 541–548.
- Strickland W. N., Strickland M. S., C. De Groot P. 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.
- Subirana J. A., Cozcolluela C., Palau J. and Unzeta M. (1973) Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim. biophys. Acta* **317**, 364–379.
- Subirana J. A., Puigjaner L. C., Roca J., Llopis R. and Svan P. (1975) X-ray diffraction of nucleohistones from spermatozoa. *Ciba Foundation Symposium* **28**, 157–179.
- Subirana J. A. (1975) On the biological role of basic proteins in spermatozoa and during spermiogenesis. *The Biology of the Male Gamete* (Edited by J. C. Duchett and P. A. Pacey), pp. 239–244. Academic Press, New York.
- Van Helden P. D., Strickland W. N., Brandt W. F. and Von Holt C. (1979) The complete amino acid sequence of histone H2B from the mollusc *Patella granatina*. *Eur. J. Biochem.* **93**, 71–78.
- Van Houtte-Durand G., Mizon J., Sautière P. and Biserte G. (1977) Histones from gonads of the star-fish *Asterias rubens*. *Comp. Biochem. Physiol.* **57B**, 121–126.
- Vendrey R. and Vendrey C. (1965) Biochemistry of histones and protamines. V—Chemistry and cytochemistry of nucleic acids and nuclear proteins. *Protoplasmatologia* band V, pp. 39–88. Springer, Wien.
- Von Holt C., Strickland W. N., Brandt E. F. and Strickland

- M. S. (1979) More histone structures. *FEBS Lett.* **100**, 201-218.
- Watson D. C., Wong C. W. and Dixon G. D. (1979) The complete amino acid sequence of a trout-testis non-histone protein, H6, localized in a subset of nucleosomes and its similarity to calf-thymus non-histone proteins HMG-14 and HMG-17. *Eur. J. Biochem.* **95**, 193-202.
- Wouters-Tyrou D., Sautière 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., Sautière P. and Biserte G. (1982) The amino acid sequence of histone H2A from cuttle-fish *Sepia officinalis*. *Eur. J. Biochem.* **124**, 489-498.

COMMENTAIRE

L'étude des protéines nucléaires basiques du sperme des Invertébrés marins s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherches coordonnées concernant l'organisation de la chromatine dans le spermatozoïde mûr et au cours de sa différenciation. Cette étude entreprise en collaboration avec Daniel SELLOS (Concarneau, Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France : directeur Yves LE GAL) bénéficie d'un contrat de recherches du Ministère de l'Industrie et de la Recherche (Action Concertée "Biologie Cellulaire Marine" - Organisation de la chromatine dans le spermatozoïde et au cours de sa différenciation - N° 84.C.0942). Daniel SELLOS (1984-a) a isolé et purifié les protéines basiques de la chromatine du sperme d'Huître (*Crassostrea gigas*) (SELLOS, 1984-b), de Crevette (*Palaeomon serratus*) et d'un Ver marin (*Platynereis dumerilii*). Nous en avons déterminé la composition en acides aminés.

En ce qui concerne *Platynereis dumerilii*, annélide polychète errant, le choix de ce modèle se justifie par sa position au sein d'un *phylum* très diversifié, et aussi parce que la reproduction chez les annélides a fait l'objet d'études très importantes par DURCHON et coll. (FISCHER, A. and PFANNENSTIEL, H.D., 1984).

D'une façon générale, toutes les histones somatiques sont présentes dans le sperme de ces Invertébrés. Cependant les histones H1 renferment plus de résidus d'arginine que leurs homologues isolées des Vertébrés supérieurs.

La chromatine du sperme de *Platynereis dumerilii* renferme:

* deux histones H1 de taille moléculaire supérieure à 20.000.

* une histone spécifique de taille moléculaire 13.200 pouvant être rattachée au groupe des histones H1 par sa solubilité dans l'acide perchlorique à 5% et par certains caractères de sa composition en acides aminés (Taux de lysine, proline et arginine élevés). Cette molécule représente 80% en poids de la fraction H1.

* En ce qui concerne les core-histones il faut signaler des histones H3 et H4 similaires à celles des tissus somatiques. L'histone H2A de *Platynereis* présente les caractéristiques des histones homologues d'Invertébrés marins : présence de deux résidus de phénylalanine, d'un résidu de méthionine, délétion de deux résidus d'histidine. L'histone H2B de *Platynereis* est caractérisée par un rapport Lys/Arg de 1 (alors que pour l'histone H2B de thymus de Veau ce rapport est de 2.5. Elle s'apparente aux histones H2B d'Invertébrés marins enrichies en résidus d'arginine (PHELAN et coll., 1972 ; STRICKLAND et coll., 1980 ; VAN HELDEN et coll., 1979 ; MAZEN et coll., 1978). Cette richesse en arginine n'est toutefois pas comparable à celle de l'histone H2B d'Oursin isolée par STRICKLAND et coll. (1978), qui demeure une observation ponctuelle difficilement généralisable aux histones H2B de sperme des autres Invertébrés marins. En outre la chromatine de sperme de *Platynereis* ne renferme pas de variants de l'histone H2B contrairement à ce qu'ont observé STRICKLAND et coll. (1978) dans la chromatine de l'Oursin *Parechinus angulosus* qui en renferme trois.

Outre les histones, la chromatine du spermatozoïde de *Platynereis* renferme deux protamines de 60 et 68 résidus qui ne diffèrent que par leur taux d'arginine. Ces molécules sont dépourvues d'acide glutamique, de cystéine, d'isoleucine et d'acides aminés aromatiques, caractéristiques communes aux protamines d'Invertébrés marins isolées par SUBIRANA et coll. (1973), BALHORN et coll. (1979) et DE PETROCELLIS et coll. (1983).

En ce qui concerne la protamine du sperme de *Chaetopterus variopedatus*, annélide voisin de *Platynereis* isolée par DE PETROCELLIS et coll. (1983), elle est proche des protamines de *Platynereis* mais s'en distingue par un taux de lysine trois fois plus élevé. Ces auteurs n'ont pas mis en évidence de core-histones dans le sperme de *Chaetopterus variopedatus* alors qu'une histone H1 est présente. A notre avis les méthodes de préparation employées pour isoler ces histones (Absence d'inhibiteurs de protéolyse et extraction H_2SO_4 0.4 N avec précipitation des histones par 4 volumes d'acétone) ne peuvent nous permettre d'affirmer avec certitude qu'aucune core-histone n'est présente dans le sperme de cet annélide voisin de *Platynereis*.

BIBLIOGRAPHIE

- BALHORN, R., LAKE, S. and GLEDHILL, B.L. (1979)
Electrophoretic analysis of nuclear proteins isolated from sperm of the black abalone *Haliotis crakeroidii*.
Exp.Cell.Res. 123, 414-417.
- DE PETROCELLIS, B., PARENTE, A., TOMEI, L. and GERACI, G. (1983)
An H1 histone and a protamine molecule organize the sperm chromatin of the marine worm *Chaetopterus vario-pedatus*.
Cell Differentiation 12, 129-135.
- FISCHER, A. and PFANNENSTIEL, H.D. (1984)
Polychaete reproduction.
Progress in Comparative Reproductive Biology.
International Symposium Helgoland.
Gustav Fischer Verlag - Stuttgart New-York 1984.
- MAZEN, A., CHAMPAGNE, M., WILHEM, M. and WILHEM, F.X. (1978)
The structure of *Sipunculus nudus* erythrocyte chromatin.
Expl.Cell.Res. 117, 431-438.
- PHELAN, J.J., SUBIRANA, J.A. and COLE, R.D. (1972)
An unusual group of lysine-rich histones from gonads of a sea cucumber *Holothuria tubulosa*.
Eur.J.Biochem. 31, 63-68.
- SELLOS, D. (1984-a)
Les protéines basiques chromosomiques des spermatozoïdes d'Invertébrés marins.
(Contribution à l'étude de la structure de la chromatine)
Thèse de Doctorat ès Sciences.
- SELLOS, D. (1984-b)
The histones isolated from the sperm of the oyster *Crassostrea gigas*.
Cell Differentiation (acceptée pour publication)
- STRICKLAND, M., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F., VON HOLT, C., WITTMAN-LIEBOLD, B. and LEHMANN, A. (1978)
The complete amino acid sequence of histone H2B from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*.
Eur.J.Biochem. 89, 443-452.
- STRICKLAND, M.S., STRICKLAND, W.N. and VON HOLT, C. (1980)
The histone H2B from the sperm cell of the starfish *Marthasterias glacialis*.
Eur.J.Biochem. 106, 541-548.

SUBIRANA, J.A., COZCOLLUELA, C., PALAU, J. and UNZETA, M. (1973)
Protamines and other basic proteins from spermatozoa
of molluscs.
Biochim. Biophys. Acta 317, 364-379.

VAN HELDEN, P.D., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F. and VAN HOLT, C.
(1979)
The complete amino acid sequence of histone H2B from
the mollusc *Patella granatina*.
Eur. J. Biochem. 93, 71-78.

II - 3 SÉQUENCE COMPLÈTE DES DEUX VARIANTS DE L'HISTONE H1
SPÉCIFIQUE DU SPERME DE *PLATYNEREIS DUMERILII*

PRIMARY STRUCTURE OF THE TWO VARIANTS OF A SPERM-SPECIFIC
HISTONE H1 FROM THE ANNELID *PLATYNEREIS DUMERILII*

Daniel KMIECIK¹, Daniel SELLOS², Denise BELAÏCHE¹ and
Pierre SAUTIERE¹

¹Unité Associée CNRS 409 Place de Verdun 59045 Lille Cédex, France

²Laboratoire de Biologie Marine, Collège de France, B.P.11,
29182 Concarneau, France

Correspondence and proofs should be sent to :

Daniel KMIECIK

Unité Associée CNRS 409 Place de Verdun 59045 Lille Cédex, France

Subdivision : Protein chemistry and structure

D. KMIĘCIK, D. BELAÏCHE and P. SAUTIERE, "Structure et interaction des protéines associées au DNA des Eucaryotes et des Procaryotes". Unité Associée 409 CNRS, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun 59045 Lille Cédex, France

D. SELLOS, Laboratoire de Biologie Marine du Collège de France, Boîte Postale 11, 29182 Concarneau, France

Abbreviations :

TosPheCH₂Cl, N-tosylphenylalanyl chloromethane ;

PhMeSO₂F , phenylmethylsulfonyl fluoride ;

iPr₂PF , diisopropylfluorophosphate ;

HPLC, high-pressure liquid chromatography ;

GC , gas chromatography.

Enzymes :

Staphylococcus aureus V8 protease (E.C.3.4.21.19) ;

Trypsin (E.C.3.4.21.4) ;

Pepsin (E.C.3.4.23.1) ;

Thermolysin (E.C.3.4.24.4) ;

Elastase (E.C.3.4.21.11)

Carboxypeptidase A (E.C.3.4.17.1)

Carboxypeptidase B (E.C.3.4.17.2)

SUMMARY

The amino acid sequences of the two variants (H1a : 121 residues and H1b : 119 residues) of the sperm specific histone H1 from the Polychaete Annelid *Platynereis dumerilii* have been completely established.

Comparison of the sequences of these two variants shows one deletion of two residues in histone H1b and 22 substitutions, of which most occur in the globular domain. The two variants highly differ in a sequence of nine residues adjacent to the conservative phenylalanine residue of histone H1 (64 to 72 in H1a, 62 to 70 in H1b) which makes H1a less hydrophobic than H1b.

The small molecular size of *Platynereis* H1a and H1b is an unique feature among the histones H1 of which the size ranges between 189 residues (chicken erythrocyte H5) and 248 residues (sea urchin sperm H1).

H1a and H1b have short N- and C-terminal basic domains but the size of the globular domain (~ 80 residues) is similar to that of other H1s.

In the globular region the variant H1a exhibits a close relationship with somatic or sperm H1s whereas the variant H1b is more related to H5 histones.

INTRODUCTION

In eukaryotic chromatin the first level of DNA-compacting is obtained with the nucleosomal structure where the four core-histones and mainly H3 and H4 play a fundamental role [1, 2]. Higher order structures in chromatin are induced by histone H1 [3]. Somatic cells contain usually 4-5 subtypes of H1 [4, 5]. In nucleated erythrocytes of birds, amphibians, reptiles and fishes, a specific histone, H5, related to H1 is present [6, 7]. Histone H5 which replaces progressively but partially histone H1 during the maturation of the erythroid cell, seems to play a critical role in establishing and maintaining the highly repressed state of chromatin in these erythrocytes [8]. The sperm cells of Echinoderms contain somatic type histones (H2A, H3 and H4) together with sperm specific histones (H1 and H2B) [9-15]. The sperm specific histones differ from their somatic counterparts both by a high amount of arginine and by peculiar structural features such as extended sequences and pentapeptidic repetitive sequences [16, 17]. The presence of these specific histones in sperm cells has to be related with the condensation and the repression of the chromatin, which occur in the male gamete during the spermatogenesis.

Since more informations were needed about sperm specific histones we decided to investigate the basic protein complement of mature sperm cells from an annelid, *Platynereis dumerilii*, a rambling polychaete.

The hormonal control of the reproduction of Annelids has been studied in detail [18]. But nothing is known about the organization of the sperm chromatin in these organisms. Recently SELLOS and KMIECIK [15] have shown that *Platynereis* sperm chromatin contains somatic type histones together with two variants H1a and H1b of a sperm specific histone H1 and two protamines.

This paper deals with the determination of the complete amino acid sequence of both H1 variants.

MATERIALS AND METHODS

The isolation and the characterization of the sperm specific histone H1 from the annelid *Platynereis dumerilii* have been described in [15].

- Staphylococcal V8 protease was from Miles Laboratories. Trypsin (treated with $\text{TosPheCH}_2\text{Cl}$), carboxypeptidase A (treated with PhMeSO_2F) and pepsin were obtained from Worthington. Carboxypeptidase B (treated with iPr_2PF) was from Boehringer, thermolysin was from Merck and porcine elastase from Calbiochem.

- Trifluoroacetic acid, 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 Beckman. Polybrene was purchased from Aldrich and the

dipeptide Gly-Gly from Sigma. Acetonitrile for high-pressure liquid chromatography was from Carlo Erba. All other reagents were of the highest purity available.

- Amino acid analyses of peptides were performed on a Beckman 119CL amino acid analyser, after hydrolysis in 6 M HCl at 110°C in vacuo for 24 h with one drop of 1% phenol to prevent excessive degradation of tyrosine.

Structural studies

** Amino terminal analysis*

Dansylation of the protein H1 was performed according to GRAY [19] followed by hydrolysis of the labelled protein for 16 hours with 6 M HCl. The amino-terminal-dansylaminoacid was identified by thin layer chromatography on polyamide sheet [20].

** Carboxy-terminal analysis*

100 nmol of histone H1 or of carboxy-terminal fragments obtained by cleavage of the protein with staphylococcal protease or pepsin, were dissolved in 0.6 ml of 0.2 M N-methyl morpholine acetate pH 8.5 and digested at 37°C with carboxypeptidase B (45 µg for the protein and 22 µg for its fragments). At 60 min. an aliquot (0.2 ml) was taken off, acidified with glacial acetic acid and freeze-dried. Carboxypeptidase A (78 µg for the protein and 36 µg for its fragments) was then added. At 60 min. and 120 min. following addition of carboxypeptidase A, aliquots (0.2 ml) were taken off and treated as above. The released amino acids were analysed on the amino acid analyser.

* *N*-bromosuccinimide cleavage of the protein [21]

64 mg (4 μ mol) of histone H1 were dissolved in 2 ml of 50% acetic acid (v/v). 6.4 mg (36 μ mol) of *N*-bromosuccinimide dissolved in 4 ml of 50% acetic acid were then added. The reaction was allowed to process under magnetic stirring at 25°C for 4 hours. The mixture was then diluted up to 40 ml with distilled water and freeze-dried.

* *Enzymatic hydrolyses*

- Histone H1 (44 mg \approx 3.6 μ mol) was hydrolysed with V8 staphylococcal protease in 0.05 M ammonium acetate (4 ml) at pH 4.0 and 37°C for 4 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1/50 (w/w). The hydrolysate was then freeze-dried.

- The tryptic digestion of histone H1 (60 mg \approx 5 μ mol) was carried out in 0.1 M ammonium bicarbonate (6 ml) pH 8.0 at 37°C for 4 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1/50 (w/w). The digestion was stopped by lowering the pH at 3.5 with formic acid and the hydrolysate was freeze-dried.

- Histone H1 (52 mg \approx 4.3 μ mol) was dissolved in 5% formic acid (4 ml) and hydrolysed with pepsin at 37°C for 1 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1/50. The hydrolysate was then directly applied to a Sephadex G50 column.

* *Fractionation of peptides*

- Fragments generated from histone H1 either by *N*-bromosuccinimide cleavage or by hydrolysis with staphylococcal protease were separated by chromatography on a Biogel P10 column (200x2.5cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

- Tryptic peptides of histone H1 were separated by ion-exchange chromatography at 60°C on a Chromobeads P column (100x0.635cm) (Technicon Corporation) with pyridine-formate and pyridine-acetate buffers using a gradient system from 0.1 M to 2 M in pyridine and from pH 2.9 to pH 5.0 [22]. After completion of the gradient, the column was eluted for 24 h with 2 M pyridine-acetate buffer pH 5.0 and then with 2 M pyridine-acetate buffer pH 7.0 for 5 h to release the highly basic peptides from the column.

Further purification of peptides was achieved by preparative chromatography and/or preparative electrophoresis on Whatman 3 MM paper [23].

- Pepsin peptides of histone H1 were fractionated on a Sephadex G50 fine column (200x2.5cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Further purification of the peptides was achieved by reverse-phase high-pressure liquid chromatography on a column of C₁₈ μ Bondapak (Waters Associates) using a Waters Associates ALC/GPC 244 apparatus equipped with a U16K sample injector and a Cecil 212 variable-wavelength ultraviolet monitor. The column was equilibrated in 0.05% trifluoroacetic acid and eluted with three linear gradients of acetonitrile in 0.05% trifluoroacetic acid : from 0 to 20% for 2 min , from 20 to 50% for 40 min and finally from 50 to 100% for 5 min. All runs were carried out at room temperature at a constant flow rate of 2 ml/min. The solvents were degassed for 20 min by sonication and for 1 min under vacuum with stirring.

* *Sequence analysis*

Automated Edman degradation was performed with a Beckman 890C sequencer using a dimethylbenzylamine program (082773) [24] for the histone H1 and a dimethylallylamine program (102974) in the presence of polybrene for the large peptides generated by chemical or enzymatic cleavages of the protein [25, 26].

Small peptides were sequenced by manual Edman degradation [27]. The phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified by high-pressure liquid chromatography and gas chromatography as described in [28].

* *Nomenclature of peptides*

Peptides obtained by cleavage of the protein at glutamyl residue with the V8 staphylococcal protease were designated by SP. Tryptic and pepsin peptides were designated by T- and P- respectively. Peptides obtained by cleavage of the C-terminal pepsin fragment P-9 with thermolysin and elastase were designated by Th- and E- respectively.

Peptides were numbered according to their position in the sequence of the protein. Since *Platynereis dumerilii* sperm histone H1 is indeed constituted of two variants H1a and H1b and that most of the structural studies were performed on the mixture of the two variants, some peptides are termed -a or -b according to their origine.

RESULTS

The sperm specific histone H1 from the annelid *Platynereis dumerilii* represents 80% of the total H1 fraction present in sperm chromatin and is constituted of two variants H1a and H1b which can be separated from each other by ion-exchange chromatography on sulfopropyl-sephadex [15] (Fig.1-A). The electrophoretic analysis of the variants on polyacrylamide slab gel at pH 3.2 in 6 M urea is shown in Fig.1-B.

Amino acid compositions of H1a and H1b are given in Table 1, together with that of the unfractionated sperm specific H1. H1a and H1b are two closely related variants which differ only by their content in aspartic acid, threonine, serine and hydrophobic residues with bulky side chains.

Alanine was found at the amino terminal end of H1a and H1b by dansylation.

When digested with carboxypeptidases A and B, both variants were shown to have the same carboxyterminal sequence, established as Lys-Asn-Arg-Asn(OH) from kinetic study of the digestion.

The strategy used to determine the amino acid sequence of the sperm specific histone H1 was firstly intended to produce a minimum of large adjacent or overlapping fragments by highly specific enzymatic or chemical cleavages.

Sequence data provided by automated Edman degradation of the large fragments and of the uncleaved H1 were completed and/or confirmed by sequence analysis of small peptides generated by hydrolysis of the protein or its large fragments with trypsin, pepsin, thermolysin and elastase (Fig.2).

In the early phases of our work, the automated degradation of sperm specific histone H1, clearly indicated the presence of two polypeptides chains, H1a and H1b, with strong structural homologies (Table 2, miniprint section). Moreover it provided useful informations concerning the position of the two tyrosine residues in the sequence of the protein.

The subsequent cleavages of the tyrosyl bonds by N-bromosuccinimide generated a large fragment NB-1, corresponding to the carboxy-terminal two-thirds of histone H1 (Fig.2 and Table 1). NB-1 was successfully submitted to thirty three steps of automated Edman degradation (Table 3, miniprint section). Obtention of two phenylthiohydantoin derivatives of amino acid at steps 1, 8, 13, 15, 20, 26 and 27 evidenced the presence of two structurally related polypeptide chains H1a and H1b in the approximate ratio of 3 : 7.

The next approach to the elucidation of the amino acid sequence of H1a and H1b was the use of the V8 staphylococcal protease for the cleavage of the single glutamyl

bond identified in variant H1b at position 63 by previous structural analyses. As expected the hydrolysis of the unfractionated H1 with V8 staphylococcal protease yielded two large fragments SP-1b (1-63) and SP-2b (64-119) which were separated on Biogel P-10 (Fig.3, miniprint section). SP-2b was obtained contaminated by a small fragment SP-1a (1-27) generated by the partial cleavage of the bond Glu-Arg in variant H1a. This bond is generally found resistant to hydrolysis by V8 staphylococcal protease [29, 30].

The amino acid compositions of fragments SP-1a, SP-1b and SP-2b are given in Table 1. Automated Edman degradation of fragment SP-1a up to penultimate residue (Table 4, miniprint section) provided to us valuable information to elucidate unequivocally the amino-terminal sequence of the minor variant H1a. Fragment SP-2b was successfully submitted to 29 cycles of automated Edman degradation (Table 5, miniprint section). Its carboxy-terminal sequence was found to be identical to that of the uncleaved H1 by digestion with carboxypeptidases A and B (Fig.8).

The sequence data provided by NB-1 and SP-2b indicated a strong structural homology with the sequence around the single phenylalanine residue present at position 93 in the sequence of chicken erythrocyte histone H5 (Fig.10) [31]. We took opportunity of this feature to hydrolyse the sperm specific histone H1 with pepsin in order to obtain the

highly basic carboxy-terminal fragment P-9 by specific cleavage of the phenylalanyl bond at position 73 in H1b and 75 in H1a.

Fragment P-9 was separated from the small peptides derived from the amino-terminal region of the protein by chromatography on Sephadex G50 (Fig.4, miniprint section). The small pepsin peptides were subsequently fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (Fig.5, miniprint section). Their amino acid compositions and their sequences are given in Table 10 (miniprint section). These peptides were found to be useful to establish unequivocally the amino terminal sequence of each variant up to the phenylalanine residue at position 75 in H1a and 73 in H1b.

The amino acid composition of fragment P-9 is given in Table 1. This fragment, rich in lysine residues was treated by 3-sulfo-phenyl-isothiocyanate according to DWULET [32], using the reagent, in quantity just sufficient to derivatize only partially the ϵ -amino groups. The derivatized fragment P-9 was subsequently submitted to 21 cycles of automated Edman degradation (Table 6, miniprint section). From data provided by carboxypeptidase digestions, the carboxy-terminal sequence of fragment P-9 was established as Lys-Asn-Arg-Asn(OH) and found to be identical to that of the uncleaved protein. The remainder of the sequence of fragment P-9 was deduced from sequence analysis of peptides generated by hydrolysis of P-9 by

thermolysin and elastase. The separation of each set of peptides was achieved by reverse-phase high-pressure liquid chromatography (Fig.6 and 7, miniprint section). The amino acid composition and the sequence analysis of thermolysin and elastase peptides are given in Tables 7 and 8 respectively (miniprint section). Peptide Th-3 (86-94) was obtained together with peptide Th-3d (87-94) by incomplete cleavage of the Ala-Ala bond with thermolysin. On the other hand, peptide Th-6b was assigned to variant H1b in respect to the amount of alanine and lysine in fragment SP-2b (Table 1 and Table 7, miniprint section). The peptides obtained by digestion of fragment P-9 with elastase were used to align the thermolysin peptides (Fig.9-B).

Finally in order to confirm the sequence data provided by the automated Edman degradation of histone H1 and of its fragments, the protein was hydrolysed with trypsin. The fractionation of the tryptic peptides by ion-exchange chromatography is shown in Fig.8 (miniprint section). Their amino acid compositions and their sequences are given in Table 9 (miniprint section).

Complete sequence of variants H1a and H1b

The automated Edman degradation of the sperm specific histone H1 from *Platynereis dumerilii* allowed us to establish a sequence of 45 amino acid residues in which the identification of two phenylthiohydantoin derivatives

after the third cycle of degradation and mainly the identification of phenylthiohydantoin histidine at cycles 9 and 11, led us to postulate the presence of two polypeptide chains H1a and H1b of closely related sequences.

In the whole H1, H1a and H1b were found in an approximate ratio of 3 : 7. This ratio was calculated from the yield of phenylthiohydantoin derivatives of amino acid obtained at cycles 1, 8 and 13 of automated Edman degradation of fragment NB-1 (Table 3, miniprint section).

The sequence data provided by the automated Edman degradation of the unfractionated H1 (Table 2, miniprint section) were fully understood after the sequence analysis of fragment SP-1a and of pepsin peptides P-1a and P-1b (Fig.9). The sequence Thr-Ala₆ present in P-1a is deleted in P-1b, this deletion explains the shift which can be observed between the sequences of variants H1a and H1b.

Amino acid sequence of variant H1a

The peptides SP-1a, P-3a and T-4a were placed according to the data provided by the automated Edman degradation of unfractionated H1. The peptide T-4a which contains the two tyrosine residues present in H1 overlaps the amino-terminal end of fragment NB-1. The amino-terminal sequence (45-77) was confirmed by sequence analysis of peptides P-5a, T-6a, P-8a and T-8a. The carboxy-terminal sequence of variant H1a was established from sequence analysis of fragment P-9 generated by cleavage with pepsin of the single Phe-Arg bond present in H1.

Amino acid sequence of variant H1b

Since H1b is the most abundant of the two variants present in sperm specific H1 from *Platynereis*, the automated Edman degradation of unfractionated H1 gave us unequivocal sequence data up to residue 45. This sequence was confirmed by sequence analysis of peptides P-1b, P-2b, P-4b and T-4b. The peptide T-4b provided the necessary overlap with fragment NB-1. The sequence analysis of this fragment together with that of peptides T-5b, T-6b, P-6b, T-7b, P-7b and T-8b allowed us to extend the amino-terminal sequence of variant H1b up to residue 75.

The carboxy-terminal sequence of H1b was determined from sequence analysis of fragment P-9 (residues 74-119). An interesting overlap of the amino-terminal sequence (residues 1-75) of H1b and of fragment P-9 was provided by fragment SP-2b (residues 64-119) obtained by cleavage with V8 staphylococcal protease of the single glutamyl bond present in H1b at position 63. Moreover obtaining fragment SP-2b was of great value for the unambiguous assignment of leucine and alanine at positions 80 and 111 of H1b, respectively ; in variant H1a leucine is replaced by a residue of valine and alanine by a residue of lysine.

DISCUSSION

The sperm specific H1 from *Platynereis dumerilii* consists of two closely related proteins H1a and H1b the sequences of which show about 80 per cent of homology. These sequences differ by 2 deletions (residues 6 and 7 in H1a are deleted in H1b) and 22 substitutions. Most of the substitutions are located in the hydrophobic domain of the molecules between residues 6 and 83 in H1a and 6 and 81 in H1b.

The two variants mostly differ in a sequence of nine residues (64-72 in H1a; 62-70 in H1b) adjacent to a highly conservative sequence Gly-Ser-Phe-Arg(or Lys) in the histones H1 [17, 33, 34]. The presence of the sequence Met-Leu-Val₆₅ in H1b gives to the region 62-70 of this protein a highly hydrophobic character whereas the region 64-72 in H1a exhibits an hydrophilic character. This feature could be related to a different biological role of each variant in the sperm chromatin. In fact, the comparison of the variants with histones H1 and H5 emphasizes the structural relationship of *Platynereis* H1a with sperm or somatic histones H1, and the structural relationship of *Platynereis* H1b with chicken erythrocyte histone H5. On the other hand the relative distribution of H1a and H1b in the sperm chromatin presents some similarity with that of H1 and H5 in the chicken erythrocyte chromatin : H1b and H5 each represents about 60 to 70% of the total H1 fraction in its respective tissue [8].

H1a and H1b are also characterized by the presence of repeated tetrapeptide sequences containing two basic residues. Thus the sequence Phe-Ile-Arg-Lys occurs twice in H1a (residues 54-57 and 58-61) ; the sequence Ala-Ala-Lys-Lys is found twice in each variant (residues 88-91 and 103-106 in H1a ; residues 86-89 and 101-104 in H1b) and the sequence Lys-Pro-Lys-X (where X is Ala, Ser, or Thr) is present three times in H1a (residues 91-94, 99-102 and 113-116) and twice in H1b (residues 89-92 and 97-100).

The sequences of *Platynereis* sperm H1a and H1b consist of three distinct structural domains : a short N-terminal basic sequence (residues 1-5), a central hydrophobic sequence or globular domain (residues 6-84 in H1a ; residues 6-82 in H1b) and a C-terminal basic tail where 20 of the 37 residues are basic. The size of the globular domain (about 80 residues) is remarkably constant in H1 histones (Fig.10)[17, 35] and must be related to its role in the elementary organization of the chromatin at the nucleosome level [36, 37]. This globular domain is flanked by two clusters of basic residues which are essential to anchor the protein to the DNA (Fig.9).

The comparison of the sequences of the globular domain of somatic and sperm histones H1 shows : (i) strong homologies between the different histones ; (ii) structural features specific of somatic or sperm H1 histones ; (iii) a strong structural relationship between sperm H1 and nucleated erythrocyte H5 (Fig.10) [31, 34]. Thus the sequence

His-Pro-Pro(or Thr) (residues 11-13 in H1a, 9-11 in H1b) is common to sperm and H5 histones, whereas the homologous sequence Gly-Pro-Pro(or Ala) is found only in somatic H1 histones [33, 34, 42, 43]. The sequence Ser-Glu-Met(or Leu) - Ile(or Val) is found in most H1s and H5 ; the corresponding sequences in *Platynereis* H1a and H1b are Ala-Thr-Met-Val and Ala-Thr-Ala-Val respectively. The sequence Lys-Glu-Arg in H1a (Lys-Asp-Arg in H1b) is common to somatic and sperm H1 histones. In H5 the corresponding sequence is Lys-Ser-Arg. Sperm H1 histones and nucleated erythrocyte H5 histones contain a sequence of 6 residues including two tyrosine residues (sequences 39-55 and 37-42 in H1a and H1b respectively). The tyrosine residue present at position 44 in H1a and 42 in H1b is also found in all H1 and H5. A hydrophilic sequence of 13 residues adjacent to the phenylalanine residue in the C-terminal part of the globular domain is highly conserved in all H1 except in *Platynereis* H1 ; in H5 histones the corresponding sequence (residues 83-95 in chicken H5) has a hydrophobic character due to the presence of a valine residue at position 87.

On the other hand the small sizes of the basic N- and C-terminal domains are rather unusual. By comparison with sea urchin sperm H1 where the lengths of the N- and C-terminal regions are 39 and 129 residues respectively [17] ; the N- and C-terminal domains of *Platynereis* specific H1

consist only in 5 and 37 residues respectively. The variation of the size of the basic domains in H1 histones is related to the length of the DNA in the nucleosome. Thus the chromatin of sea urchin sperm is organized in 245 base pairs repeat length [38], whereas that of *Platynereis* sperm is organized in 165 base pairs DNA repeat [39].

Since the C-terminal tail and the globular domain of H1 seem to be involved together in the condensation of chromatin [35, 40, 41], the N-terminal domain could be responsible for species and/or tissue specificity [35]. However in the case of *Platynereis* sperm H1, the tissue specificity is unlikely carried by the N-terminal domain and should rather be localised in the C-terminal sequence of the protein.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge with pleasure the skilful technical assistance of A.HEMEZ, M.J.DUPIRE and T.ERNOUT. They thank also G.BRIAND and O.HANNEDOUCHE for the sequencer runs. The authors are grateful to T.ERNOUT for editorial assistance. This work was supported by grants from CNRS and from the Ministère de l'Industrie et de la Recherche (AC n° 84C 0942).

REFERENCES

1. Mac Ghee, J.D. & Felsenfeld, G. (1980) *Ann.Rev.Biochem.* 49, 1115-1156.
2. Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J.T., & Thomas, J.O. (1980) *Nature* 287, 509-516.
3. Thoma, F., Koller, T. & Klug, A. (1979) *J. Cell.Biol.* 83, 403-427.
4. Cole, R.D. (1984) *Anal.Biochem.* 136, 24-30.
5. Dupressoir, T. & Sautière, P. (1984) *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 122, 1136-1145.
6. Neelin, J.M., Callahan, P.X., Lamb, D.C. & Murray, K. (1964) *Can.J.Biochem.* 42, 1743-1752.
7. Hnilica, L.S. (1964) *Experientia* 20, 13-16.
8. Mazen, A. & Champagne, M. (1972) *Biochimie* 54, 1273-1279.
9. Subirana, J.A., Puigjaner, L.C., Roca, J., Llopis, R. & Swan, P. (1975) in *Ciba Foundation Symposium* 28, 157-179.
10. Muñoz-Guerra, S., Azorin, F., Casas, M.T., Marcet, X., Maristany, M.A., Roca, J. & Subirana, J.A. (1982) *Exp.Cell.Res.* 137, 47-53.

11. Alder, D. & Gorosky, M.A. (1975) *J.Cell.Biol.* 64, 389-397.
12. Sellos, D. & Le Gal, Y. (1981) *Cell Differentiation* 10, 69-77.
13. Palau, J., Ruiz-Carillo, A. & Subirana, J.A. (1969) *Eur.J.Biochem.* 7, 209-213.
14. Vanhoutte-Durand, G., Mizon, J., Sautière, P. & Biserte, G. (1977) *Comp.Biochem.Physiol.* 57B, 121-126.
15. Sellos, D. & Kmiecik, D. (1984) *Comp.Biochem.Physiol.*
(Accepted for publication)
16. Strickland, M., Strickland, W.N., Brandt, W.F., Von Holt, C., Wittmann-Liebold, B. & Lehmann, A. (1978) *Eur.J.Biochem.* 89, 443-452.
17. Strickland, W.N., Strickland, M., Brandt, W.F., Von Holt, C., Lehmann, A. & Wittmann-Liebold, B. (1980) *Eur.J.Biochem.* 104, 567-578.
18. Franke, H.D. & Pfannenstiel, H.D. (1984) in *Polychaete Reproduction : progress in comparative reproductive biology* (Fischer, A. & Pfannenstiel, H.D., eds) pp.53-72, Gustav Fischer Verlag. Stuttgart-New York.
19. Gray, W.R. (1972) in *Methods in Enzymology* 25 (Hirs, C.H.W. & Timasheff, S.N. eds) pp.121-138, Academic Press New York

20. Doolittle, R.F. (1977) in *Advanced Methods in Protein Sequence determination* (Needlman, S.B. ed.) pp.38-54, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
21. Ramachandran, L.K. & Witkop, B. (1967) in *Methods in Enzymology 11* (Hirs, C.H.W. ed.) pp.283-295, Academic Press New York
22. Wouters, D., Sautière, P. & Biserte, G. (1978) *Eur.J. Biochem.* 90, 231-239.
23. Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. & Biserte, G. (1970) *Eur.J.Biochem.* 12, 222-226.
24. Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L.H., Wade, R.D., Neurath, H. & Walsh, K.A. (1978) *Biochemistry* 17, 5672-5679.
25. Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M. & Mac Keaw, D. (1978) *Anal.Biochem.* 84, 622-627.
26. Klapper, D.G., Wilde, C.E. & Capra, J.D. (1978) *Anal. Biochem.* 85, 126-131.
27. Edman, P. & Henschen, A. (1975) in *Protein Sequence Determination*, 2nd edn, (Needlman, S.B. ed.) pp.232-279, Springer Berlin Heidelberg New York.
28. Wouters-Tyrou, D., Martin-Ponthieu, A., Briand, G. Sautière, P. & Biserte, G. (1982) *Eur.J.Biochem.* 124, 489-498.

29. Kmiecik, D., Couppez, M., Belaïche, D. & Sautière, P. (1982) *Eur.J.Biochem.* 135, 113-121.
30. Laine, B., Kmiecik, D., Sautière, P., Biserte, G. & Cohen-Solal, M. (1980) *Eur.J.Biochem.* 103, 447-461.
31. Briand, G., Kmiecik, D., Sautière, P., Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. & Champagne, M. (1980) *FEBS Letters* 112, 147-151.
32. Dwulet, F.E. & Gurd, F.R.N. (1976) *Anal Biochem.* 76, 530-538.
33. MacLeod, A.R., Wong, N.C.W. & Dixon, G.H. (1977) *Eur. J.Biochem.* 78, 281-291.
34. Von Holt, C., Strickland, W.N., Brandt, W.F. & Strickland, M.S. (1979) *FEBS Letters* 100, 201-217.
35. Böhm, L. & Crane-Robinson, C. (1984) *Bioscience Reports* 4, 365-386.
36. Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. & Aviles, F.X. (1980) *Nature* 288, 675-679.
37. Puigdomenech, P., Jose, M., Ruiz-Carillo, A. & Crane-Robinson, C. (1983) *FEBS Letters* 154, 151-155.
38. Cornudella, L. & Rocha, E. (1979) *Biochemistry* 18, 3724-3732.
39. Sellos, D. (Personal communication).

40. Ring, D. & Cole, R. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 15361-15364.
41. Losa, R., Thoma, F. & Koller, T. (1984) *J.Mol.Biol.* 175, 529-551.
42. Liao, L.W. & Cole, R.D. (1981) *J.Biol.Chem.* 256, 3024-3029.
43. Sugarman, B.J., Dodgson, J.B. & Engel, J.D. (1983) *J.Biol.Chem.* 258, 9005-9016.

Table 1. Amino acid composition^a of histones H1a and H1b from the sperm of *Platynereis dumerilii* and their large fragments NB, SP and P-9 used for automated Edman degradation

	H1	H1a	H1b	NB-1	SP-1b	SP-2b	SP-1a	P-9
Aspartic acid	6.7	6.1(6)	8.9(9)	5.7	4.4(4)	4.7(5)	0.8	3.0(4) ^c
Threonine	5.3	6.3(8)	5.6(5)	4.1	2.3(2)	3.8(3)	2.8(3)	2.9(3)
Serine	5.4	4.7(5)	4.1(4)	2.6	2.3(2)	2.0(2)		1.0(1)
Glutamic acid	2.1	2.0(2)	1.9(2)	1.8	1.3(1)	0.8(1)	1.2(1)	
Proline	6.8	7.4(7)	7.2(7)	5.0	3.1(3)	4.2(4)	2.1(2)	4.0(4)
Glycine	4.9	5.5(5)	4.6(5)	3.4	3.4(3)	1.9(2)	1.7(2)	
Alanine	21.6	22.4(21)	19.6(21)	12.2	11.4(13)	8.4(8)	6.9(7)	7.7(8)
Valine	8.4	8.5(10) ^b	9.3(11) ^b	5.6	6.6(8)	2.4(3)	2.2(2)	1.6(2-3) ^c
Methionine	2.3	2.0(2)	1.8(2)	0.5	0.9(1)	0.6(1)	0.9(1)	
Isoleucine	3.8	4.7(5)	2.9(3)	1.5	3.1(3)		1.4(1)	
Leucine	4.7	4.0(3)	5.1(6)	2.8	3.9(4)	1.6(2)	2.2(2)	0.6
Tyrosine	1.6	1.8(2)	1.7(2)		1.9(2)			
Phenylalanine	2.5	2.7(3)	2.6(3)	2.5	1.8(2)	0.9(1)		
Histidine	1.0	0.9(1)	0.8(1)		0.9(1)		1.1(1)	
Lysine	30.9	30.1(29)	29.9(26)	22.6	6.8(6)	20.1(20)	3.5(2)	17.6(19-20)
Arginine	11.5	11.9(12)	11.5(12)	6.8	8.5(8)	3.5(4)	2.9(3)	3.0(4) ^c
Number of residues		121	119		63	56	27	46

a Results are expressed as number of residues/mol protein or peptide. Values in parentheses are residues/mol derived from the final sequence.

b Low values are due to incomplete cleavage of a Val-Val bond.

c Low values for aspartic acid, valine and arginine in P-9 result of the partial lost of the amino-terminal sequence Arg-Val-Asn of peptide P-9 by incomplete cleavage of the bond Asn-Lys with pepsin.

Table 2. Automated Edman degradation of histone H1 from *Platynereis* sperm

Cycle and residue number	Major protein H1b		Minor protein H1a		Identification
	Residue	Yield	Residue	Yield	
1	Ala	139	Ala		HPLC
2	Arg		Arg		HPLC
3	Arg	170	Arg		HPLC
4	Lys	108	Arg	95	HPLC
5	Arg	108	Lys	78	HPLC
6	Ala	69	Thr	13	HPLC
7	Ala	92	Ala		HPLC
8	Thr	21	Ala	63	HPLC
9	His	52	Ala	49	HPLC
10	Pro	18	Ala	47	HPLC
11	Pro	20	His		HPLC, GC
12	Val	37	Pro	18	HPLC, GC
13	Ala	50	Pro	15	HPLC, GC
14	Thr	11	Val	28	HPLC, GC
15	Ala	41	Ala		HPLC, GC
16	Val	49	Thr	8,5	HPLC, GC
17	Val	55	Met		HPLC, GC
18	Ala	40	Val	42	HPLC, GC
19	Ala	44	Val	28	HPLC, GC
20	Ile	21	Thr	5	HPLC, GC
21	Leu	33	Ala	31	HPLC, GC
22	Gly	18	Ile	14	HPLC, GC
23	Leu		Leu		HPLC
24	Lys	39	Gly	12	HPLC
25	Asp		Leu	20	HPLC
26	Arg	22	Lys	31	HPLC
27	Lys	13	Glu		HPLC
28	Gly	28	Arg		HPLC
29	Ser	3	Lys	54	HPLC
30	Ser	5	Gly	23	HPLC, GC
31	Met	34	Ser	6	HPLC, GC
32	Val	33			HPLC, GC
33	Ala	35	Met		HPLC, GC
34	Ile		Val	21.5	HPLC, GC
35	Lys	22	Ala	15	HPLC
36	Lys	27			HPLC
37	Tyr	11	Lys	26	HPLC
38	Leu	6	Lys	23	HPLC
39	Ala	11	Tyr	8	HPLC
40	Ala	13	Ile	5	HPLC
41	Asn	9	Ala	15	HPLC
42	Tyr	6	Ala	10	HPLC
43	Asn	8	Asn		HPLC
44	Val	8	Tyr	6	HPLC
45	Asp	5	Arg		HPLC

HPLC : double identification of phenylthiohydantoin of amino-acids by high-pressure liquid chromatography on columns of C₁₈ μ Bondapak and of cyanopropylsilane [28]

GC : identification by gas chromatography [28]

Table 3. Automated Edman degradation of fragment NB-1 from *Platynereis* sperm histone H1

Cycle number	Residue number		Residue	Yield (nmol)	Identification
	H1a	H1b			
1	45	43	Arg (H1a)	34	HPLC, GC
			Asn (H1b)	98	
2	46	44	Val	209	HPLC, GC
3	47	45	Asp	228	HPLC, GC
4	48	46	Val	202	HPLC, GC
5	49	47	Ala	198	HPLC
6	50	48	Arg		HPLC
7	51	49	Leu	132	HPLC
8	52	50	Ala (H1a)	54	HPLC
			Gly (H1b)	72	
9	53	51	Pro	94	HPLC, GC
10	54	52	Phe	115	HPLC, GC
11	55	53	Ile	83	HPLC, GC
12	56	54	Arg	86	HPLC
13	57	55	Lys (H1a)	39	HPLC
			Arg (H1b)	73	
14	58	56	Phe	63	HPLC, GC
15	59	57	Ile (H1a)		HPLC, GC
			Val (H1b)	87	
16	60	58	Arg	53	HPLC
17	61	59	Lys	57	HPLC
18	62	60	Ala	50	HPLC, GC
19	63	61	Val	61	HPLC, GC
20	64	62	Lys (H1a)	18	HPLC
			Ala (H1b)	41	
21	65	63	Glu		HPLC
22	66	64	Gly	12	HPLC
23	67	65	Met	75	HPLC, GC
24	68	66	Leu	10	HPLC, GC
25	69	67	Val	66	HPLC, GC
26	70	68	Gln	3	HPLC
27	71	69	Ala (H1a)	9	HPLC
			Asn (H1b)	8	
28	72	70	Lys	20	HPLC
29	73	71	Gly	6	HPLC
30	74	72	Ser		HPLC, GC
31	75	73	Phe	5	HPLC, GC
32	76	74	Arg	9	HPLC
33	77	75	Val	99	HPLC, GC

See legend of Table 2

Table 4. Automated Edman degradation of fragment SP-1a from variant H1a of *Platynereis* sperm

Cycle and residue number	Residue	Yield (nmol)	Identification
1	Ala	107	HPLC
2	Arg	37	HPLC
3	Arg	38	HPLC
4	Arg	36	HPLC
5	Lys	21	HPLC
6	Thr	35	HPLC
7	Ala	53	HPLC
8	Ala	50	HPLC
9	Ala	44	HPLC
10	Ala	39	HPLC
11	His	7	HPLC
12	Pro	23	HPLC
13	Pro	13	HPLC
14	Val	11	HPLC, GC
15	Ala	9	HPLC
16	Gly	3	HPLC
17	Met	4	HPLC, GC
18	Val	5	HPLC, GC
19	Val	4	HPLC, GC
20	Thr	1	HPLC
21	Ala	2	HPLC
22	Ile		HPLC, GC
23	Leu		HPLC, GC
24	Gly		HPLC
25	Leu		HPLC, GC

See legend of table 2

Table 5. Automated Edman degradation of fragment SP-2b from variant H1b of *Platynereis* sperm

Cycle number	Residue number	Residue	Yield (nmol)	Identification
1	64	Gly	183	HPLC, GC
2	65	Met	299	HPLC, GC
3	66	Leu	165	HPLC, GC
4	67	Val	247	HPLC, GC
5	68	Gln	55	HPLC
6	69	Asn	111	HPLC
7	70	Lys	140	HPLC
8	71	Gly	76	HPLC
9	72	Ser	21	HPLC
10	73	Phe	64	HPLC, GC
11	74	Arg	89	HPLC
12	75	Val	123	HPLC, GC
13	76	Asn	41	HPLC
14	77	Lys	72	HPLC
15	78	Thr		HPLC
16	79	Ala	54	HPLC
17	80	Leu	27	HPLC
18	81	Pro	18	HPLC
19	82	Lys	21	HPLC
20	83	Lys	37	HPLC
21	84	Lys	37	HPLC, GC
22	85	Lys	37	HPLC, GC
23	86	Ala	19	HPLC, GC
24	87	Ala	22	HPLC
25	88	Lys	24	HPLC
26	89	Lys	25	HPLC
27	90	Pro	6	HPLC
28	91	Lys	19	HPLC
29	92	Ala	10	HPLC

See legend of table 2

Table 6. Automated Edman degradation of carboxy-terminal fragment P-9* from *Platyne-reis* sperm histone H1

Cycle number	Residue number		Residue	Yield (nmol)	Identification
	P-9a	P-9b			
1	76	74	Arg	24	HPLC
2	77	75	Val	95	HPLC, GC
3	78	76	Asn	55	HPLC
4	79	77	Lys	12	HPLC
5	80	78	Thr	20	HPLC
6	81	79	Ala	29	HPLC
7	82	80	Leu	31	HPLC
			Val	44	
8	83	81	Pro	31	HPLC
9	84	82	Lys	15	HPLC
10	85	83	Lys	18	HPLC
11	86	84	Lys	16	HPLC
12	87	85	Lys	22	HPLC
13	88	86	Ala	36	HPLC
14	89	87	Ala	54	HPLC
15	90	88	Lys	12	HPLC
16	91	89	Lys	14	HPLC
17	92	90	Pro	19	HPLC
18	93	91	Lys	9	HPLC
19	94	92	Ala	19	HPLC
20	95	93	Lys	8	HPLC
21	96	94	Lys	8	HPLC

See legend of table 2

* Fragment P-9 was treated by 3-S-PITC prior to Edman degradation [32]

Table 7 . Amino acid composition and amino acid sequence of thermolysin peptides obtained from fragment P-9 of the sperm specific H1 of *Platynereis dumerilii* and used to elucidate its sequence

Th-1 : (residues 74 to 78)	Asx _{1.1(1)} , Thr _{0.9(1)} , Val _{1.0(1)} , Lys _{1.1(1)} , Arg _{0.9(1)}
	<u>Arg-Val-Asn-Lys-Thr</u>
Th-2b : (residues 79 to 85)	Pro _{1.0(1)} , Ala _{1.0(1)} , Leu _{0.6(1)} , Lys _{3.9(4)}
	<u>Ala-Leu-Pro-Lys-Lys-Lys-Lys</u>
Th-3 : (residues 86 to 94)	Pro _{1.1(1)} , Ala _{2.3(3)} , Lys _{5.6(5)}
	<u>Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Lys-Lys</u>
Th-3d : (residues 87 to 94)	Pro _{1.1(1)} , Ala _{2.2(2)} , Lys _{4.7(5)}
	<u>Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Lys-Lys</u>
Th-4 : (residues 95 to 100)	Ser _{0.8(1)} , Pro _{1.1(1)} , Val _{1.0(1)} , Lys _{3.3(3)}
	<u>Val-Lys-Lys-Pro-Lys-Ser</u>
Th-5 : (residues 101 to 108)	Asx _{1.1(1)} , Thr _{1.0(1)} , Ala _{1.1(2)} , Lys _{2.9(3)} , Arg _{0.8(1)}
	<u>Ala-Ala-Lys-Lys-Lys-Thr-Asn-Arg</u>
Th-6a : (residues 109 to 121)	Asx _{2.0(2)} , Thr _{1.2(1)} , Pro _{1.1(1)} , Ala _{1.4(1)} , Lys _{3.6(4)} , Arg _{1.9(2)}
	<u>Ala-Arg-Lys-Pro-Lys-Thr-Lys-Lys-Asn-Arg-Asn</u>
Th-6b : (residues 109 to 116)	Asx _{0.7(1)} , Thr _{0.4(1)} , Pro _{1.0(1)} , Ala _{1.5(2)} , Lys _{3.5(3)} , Arg _{0.7(1)}
	<u>Ala-Arg-Ala-Pro-Lys-Thr-Lys-Lys</u>

The letter a or b indicates that the peptide originates from variant H1a or H1b. Peptide Th-3d derives from peptide Th-3 by partial cleavage of the Ala-Ala bond (→ manual Edman degradation; ← carboxypeptidase hydrolysis)

Table 8. Amino acid composition and amino acid sequence of elastase peptides obtained from fragment P-9 of the sperm specific H1 of *Platymereis dumerilii* and used to elucidate its sequence

E-1 : (residues 74 to 79)	Asx 0.9(1), Thr 0.8(1), Ala 0.6(1), Val 0.8(1), Lys 1.9(1), Arg 0.9(1) Arg-Val-Asn-Lys(Thr,Ala)
E-2 : (residues 79 to 86)	Pro 0.9(1), Ala 2.0(2), Lys 4.0(4) Ala-Leu-Pro-Lys-Lys-Lys-Lys-Ala
E-4 : (residues 93 to 109)	Asx 1.2(1), Thr 0.9(1), Ser 1.0(1), Pro 1.8(2), Ala 2.0(2), Val 1.0(1), Lys 8.0(8), Arg 1.4(1) Lys-Lys-Val-Lys-Lys-Pro-Lys-Ser-Ala(Ala,Lys,Lys,Thr,Asn)Arg-Ala
E-4b : (residues 93 to 117)	Asx 1.7(2), Thr 2.0(2), Ser 0.8(1), Pro 2.4(2), Ala 4.2(4), Val 1.0(1), Lys 11.3(11), Arg 1.7(2) Lys-Lys-Val-Lys-Lys-Pro-Lys-Ser-Ala-Ala(Lys,Lys,Thr,Asn,Arg,Ala,Pro,Lys,Thr, Lys) Lys-Asn
E-5a : (residues 110 to 119)	Asx 1.9(2), Thr 1.4(1), Pro 1.0(1), Lys 4.0(4), Arg 2.3(2) Arg-Lys-Pro-Lys-Thr(Lys,Lys,Asn,Arg,Asn)

Table 9. Amino acid composition and amino acid sequence of tryptic peptides obtained from the specific H1 of *Platymeris dumerilii* and used to elucidate its sequence

T-4a : (residues 39 to 45)	Asx _{1.0(1)} , Ala _{1.9(2)} , Ile _{0.8(1)} , Tyr _{1.4(2)} , Arg _{1.0(1)}		
	<u>Tyr-Ile-Ala-Ala-Asn-Tyr-Arg</u>		
T-4b : (residues 37 to 48)	Asx _{2.9(3)} , Ala _{3.0(3)} , Val _{2.0(2)} , Leu _{1.1(1)} , Tyr _{1.7(2)} , Arg _{1.3(1)}		
	<u>Tyr-Leu-Ala-Ala-Asn-Tyr-Asn-Val-Asp-Val-Ala-Arg</u>		
T-5b : (residues 49 to 54)	Pro _{1.2(1)} , Gly _{1.2(1)} , Ile _{0.8(1)} , Leu _{1.0(1)} , Phe _{0.9(1)} , Arg _{1.0(1)}		
	<u>Leu-Gly-Pro-Phe-Ile-Arg</u>		
T-6a : (residues 58 to 60)	Ile _{0.9(1)} , Phe _{1.0(1)} , Arg _{1.0(1)}		<u>Phe-Ile-Arg</u>
T-6b : (residues 56 to 58)	Val _{1.0(1)} , Phe _{0.9(1)} , Arg _{1.0(1)}		<u>Phe-Val-Arg</u>
T-7b : (residues 60 to 70)	Asx _{1.1(1)} , Glx _{1.8(2)} , Gly _{1.2(1)} , Ala _{2.1(2)} , Val _{1.9(2)} , Met _{0.6(1)} , Leu _{1.0(1)} , Lys _{1.1(1)}		
	<u>Ala-Val-Ala-Glu-Gly-Met-Leu-Val-Gln-Asn-Lys</u>		
T-8a : (residues 68 to 76)	Thr _{0.9(1)} , Ser _{1.9(2)} , Gly _{2.8(3)} , Ala _{1.3(1)} , Phe _{0.9(1)} , Lys _{1.0(1)}		
	<u>Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Arg</u>		
T-8b : (residues 71 to 74)	Ser _{1.0(1)} , Gly _{1.0(1)} , Phe _{0.9(1)} , Arg _{1.1(1)}		<u>Gly-Ser-Phe-Arg</u>
T-9 : (residues 77 to 79 (H1a) and 75 to 77 (H1b))	Asx _{1.0(1)} , Val _{1.0(1)} , Arg _{1.0(1)}		<u>Val-Asn-Lys</u>
T-10b : (residues 78 to 82)	Thr _{0.8(1)} , Pro _{1.0(1)} , Ala _{1.0(1)} , Leu _{1.1(1)} , Lys _{1.0(1)}		
	<u>Thr-Ala-Leu-Pro-Lys</u>		
T-11 : (residues 88 to 90 (H1a) and 86 to 88 (H1b))	Ala _{1.8(2)} , Lys _{1.0(1)}		<u>Ala-Ala-Lys</u>
T-12 : (residues 91 to 93, 113 to 115 (H1a); 89 to 91 (H1b))	Pro _{1.0(1)} , Lys _{2.1(2)}		<u>Lys-Pro-Lys</u>
T-13 : (residues 94 to 95 (H1a); 92 to 93 (H1b))	Ala _{1.0(1)} , Lys _{1.0(1)}		<u>Ala-Lys</u>
T-14 : (residues 102 to 105 (H1a); 100 to 103 (H1b))	Ser _{1.0(1)} , Ala _{2.1(2)} , Lys _{1.0(1)}		<u>Ser-Ala-Ala-Lys</u>
T-15 : (residues 108 to 110 (H1a); 106 to 108 (H1b))	Asx _{1.0(1)} , Thr _{0.8(1)} , Arg _{1.0(1)}		<u>Thr-Asn-Arg</u>
T-16 : (residues 1 to 2, 111 to 112 (H1a); 1 to 2, 109 to 110 (H1b))		Ala _{1.0(1)} , Arg _{1.0(1)}	<u>Ala-Arg</u>
T-17b : (residues 111 to 113)	Pro _{0.8(1)} , Ala _{0.9(1)} , Lys _{1.2(1)}		<u>Ala-Pro-Lys</u>
T-18 : (residues 116 to 118 (H1a); 114 to 116 (H1b))	Thr _{1.1(1)} , Lys _{1.9(2)}		<u>Thr-Lys-Lys</u>
T-19 : (residues 119 to 121 (H1a); 117 to 119 (H1b))	Asx _{1.9(2)} , Arg _{1.0(1)}		<u>Asn-Arg-Asn</u>

Table 10 . Amino acid composition and amino acid sequence of pepsin peptides obtained from the sperm specific H1 of *Platyne-reis dumerilii* and used to elucidate its sequence

P-1a : (residues 1 to 16)	Thr _{2.0(2)} , Pro _{2.1(2)} , Ala _{5.5(6)} , Val _{1.2(1)} , His _{1.0(1)} , Lys _{1.1(1)} , Arg _{3.1(3)} <u>Ala-Arg-Arg-Arg-Lys-Thr-Ala-Ala-Ala-Ala-His-Pro</u> (Pro,Val,Ala,Thr)
P-1b : (residues 1 to 14)	Thr _{2.0(2)} , Pro _{2.1(2)} , Ala _{4.0(4)} , Val _{1.0(1)} , His _{1.0(1)} , Lys _{1.1(1)} , Arg _{3.1(3)} <u>Ala-Arg-Arg-Lys-Arg-Ala-Ala-Thr-His-Pro-Pro-Val-Ala-Thr</u>
P-2b : (residues 19 to 29)	Asx _{1.0(1)} , Ser _{1.4(1)} , Gly _{1.9(2)} , Ala _{1.0(1)} , Ile _{1.0(1)} , Leu _{1.9(2)} , Lys _{2.0(2)} , Arg _{1.0(1)} <u>Ala-Ile-Leu-Gly-Leu-Lys-Asp-Arg-Lys-Gly</u> (Ser)
P-3a : (residues 26 to 33)	Ser _{2.0(2)} , Glx _{1.0(1)} , Gly _{1.3(1)} , Met _{0.2(1)} , Lys _{2.0(2)} , Arg _{1.1(1)} <u>Lys-Glu-Arg-Lys-Gly-Ser-Ser-Met</u>
P-4b : (residues 32 to 41)	Asx _{1.7(1)} , Ala _{3.4(3)} , Val _{1.4(1)} , Ile _{0.8(1)} , Leu _{1.4(1)} , Lys _{1.9(2)} <u>Val-Ala-Ile-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Asn</u>
P-5a : (residues 44 to 58)	Asx _{1.0(1)} , Pro _{1.1(1)} , Ala _{2.8(2)} , Val _{1.8(2)} , Ile _{0.6(1)} , Leu _{2.2(1)} , Tyr _{0.9(1)} , Phe _{1.5(2)} , Lys _{0.6(1)} , Arg _{3.6(3)} <u>Tyr-Arg-Val-Asp-Val-Ala-Arg-Leu</u> (Ala,Pro,Phe,Ile,Arg,Lys,Phe)
P-6b : (residues 53 to 66)	Glx _{1.1(1)} , Gly _{1.3(1)} , Ala _{2.2(2)} , Val _{1.8(2)} , Met _{0.2(1)} , Ile _{0.9(1)} , Leu _{1.0(1)} , Phe _{1.0(1)} , Lys _{1.1(1)} , Arg _{2.9(3)} <u>Ile-Arg-Arg-Phe-Val-Arg-Lys-Ala-Val-Ala-Glu-Gly-Met-Leu</u>
P-7b : (residues 66 to 73)	Asx _{1.0(1)} , Ser _{0.9(1)} , Glx _{1.0(1)} , Gly _{1.2(1)} , Val _{0.9(1)} , Leu _{1.0(1)} , Tyr _{0.9(1)} , Lys _{0.9(1)} <u>Leu-Val-Gln-Asn-Lys-Gly</u> (Ser,Phe)
P-8a : (residues 64 to 75)	Thr _{1.9(2)} , Ser _{2.1(2)} , Glx _{1.2(1)} , Gly _{3.1(3)} , Ala _{1.3(1)} , Phe _{1.0(1)} , Lys _{1.9(2)} <u>Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe</u>

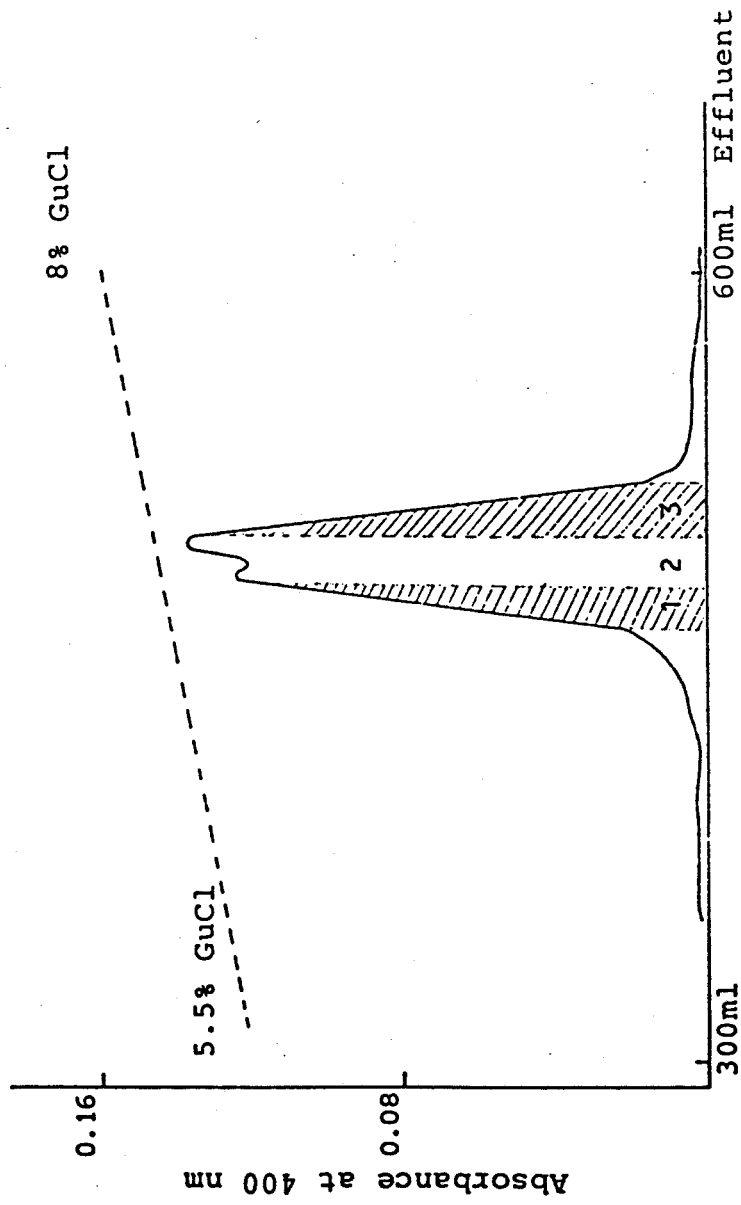


FIGURE 1-A

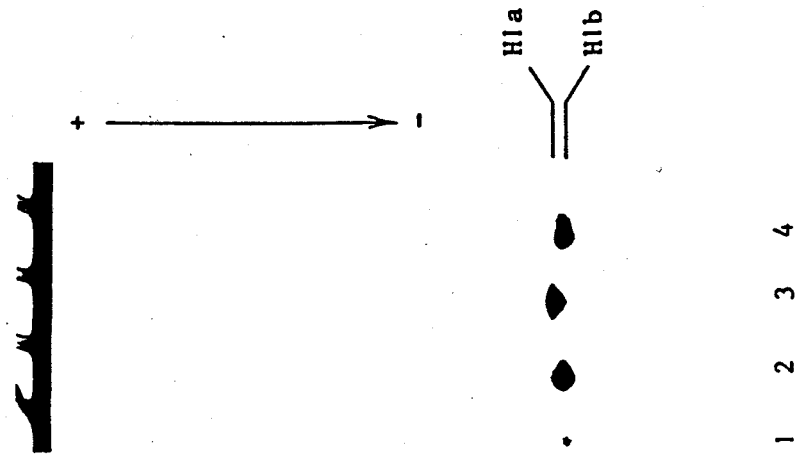


FIGURE 1-B

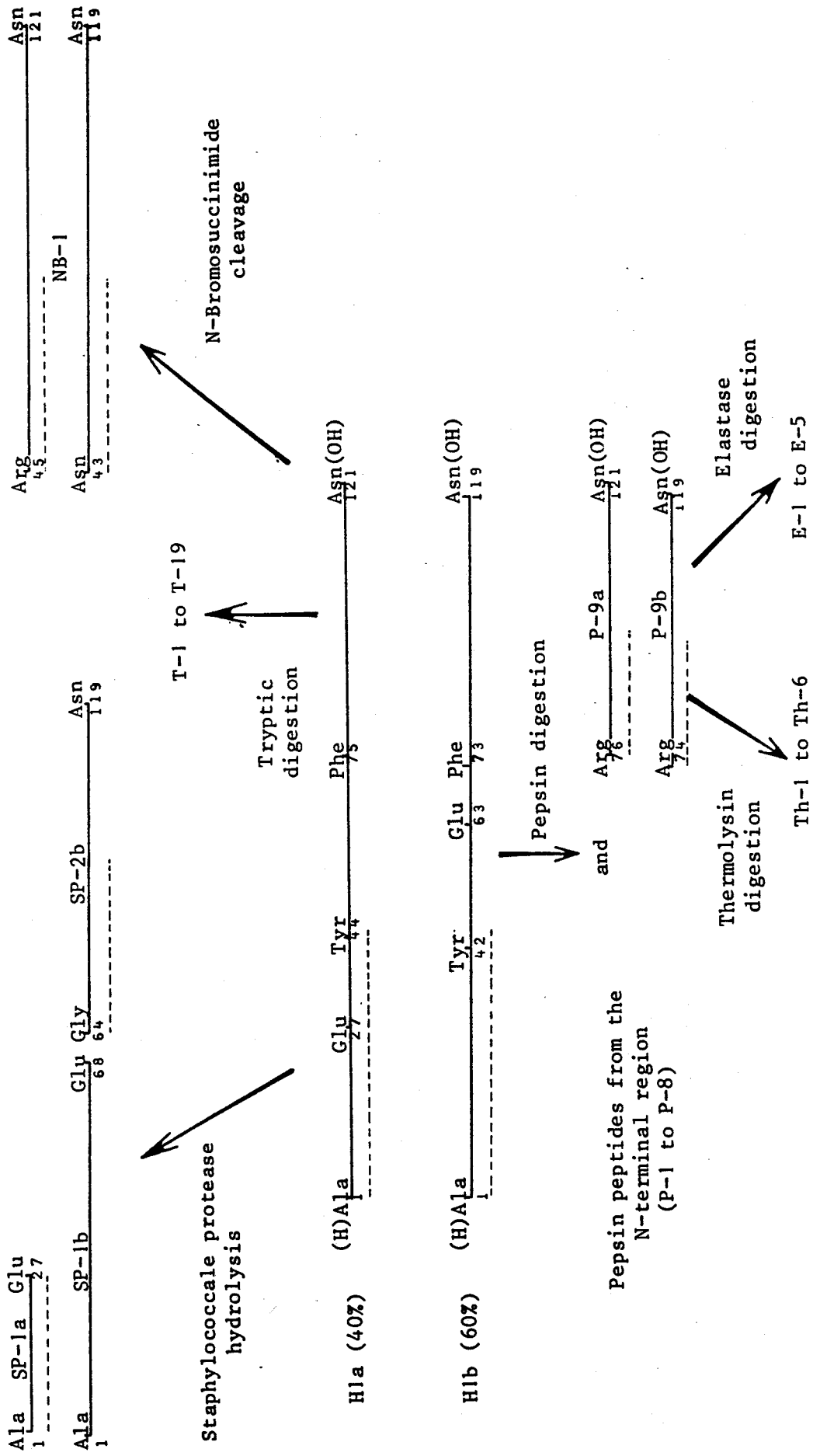


FIGURE 2 Strategy used for the amino acid sequence determination of the two variants H1a and H1b of *Platymereis dumerilii* sperm specific histone H1. (----), automated Edman degradation

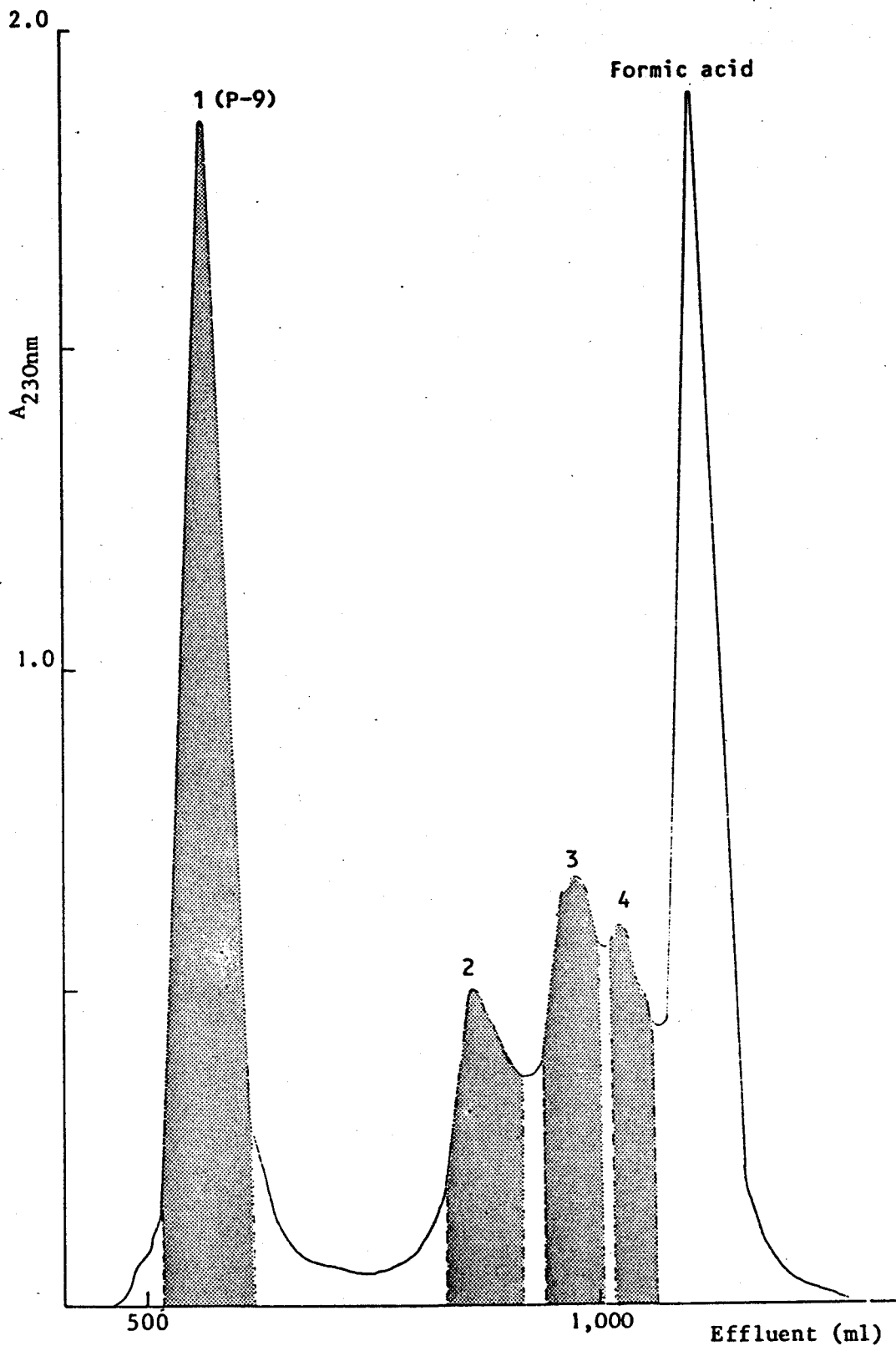


FIGURE 3 Biogel P10 chromatography of V8 staphylococcal fragments from *Platynereis* sperm H1. The column (200x2.5cm) was equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Fractions of 6 ml were collected at a flow rate of 18 ml/h.

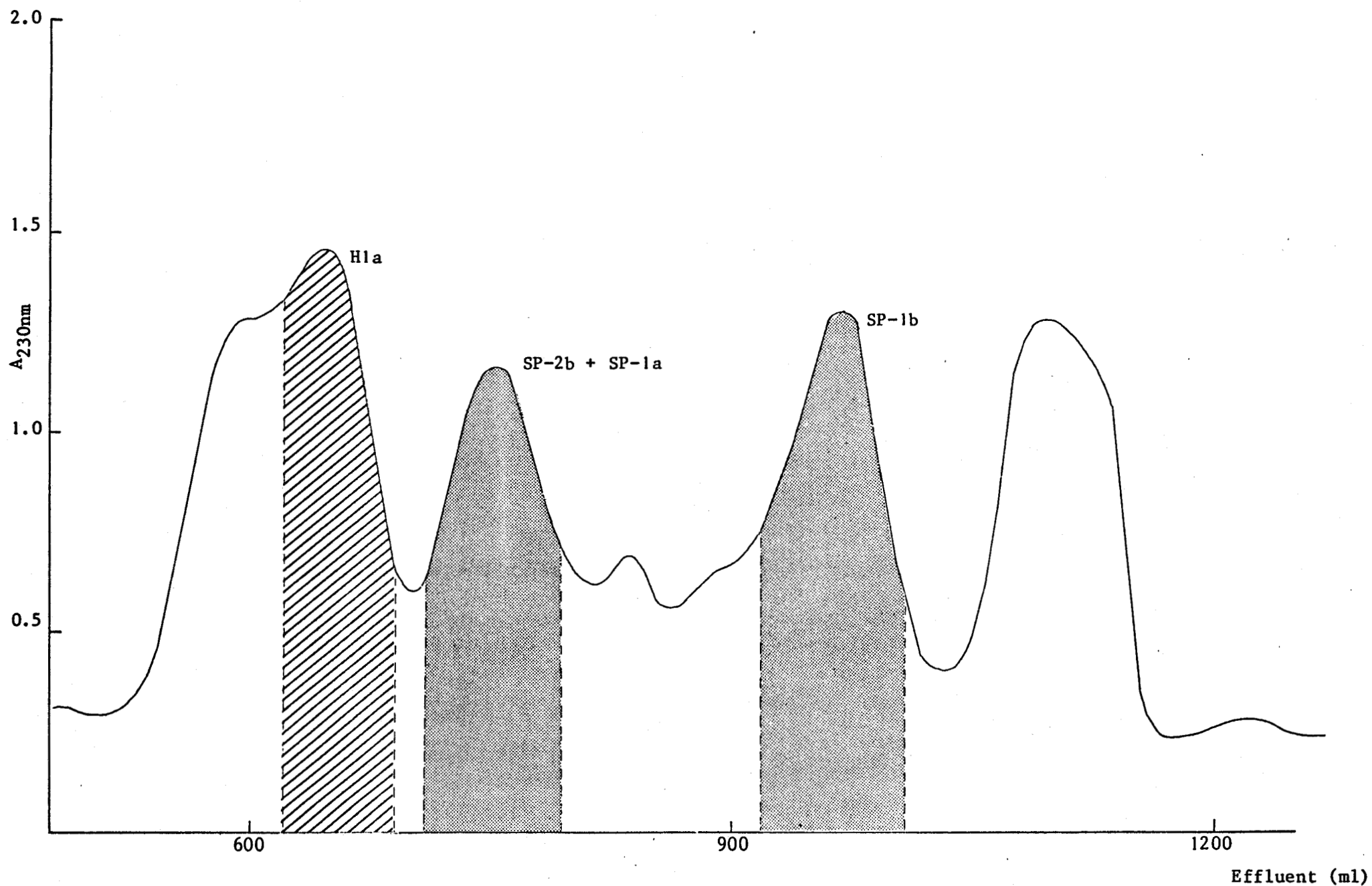


FIGURE 4 Sephadex G50 chromatography of pepsin fragments from *Platynereis* sperm H1. The column (200x2.5cm) was equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. Fractions of 7 ml were collected at a flow rate of 21 ml/h.

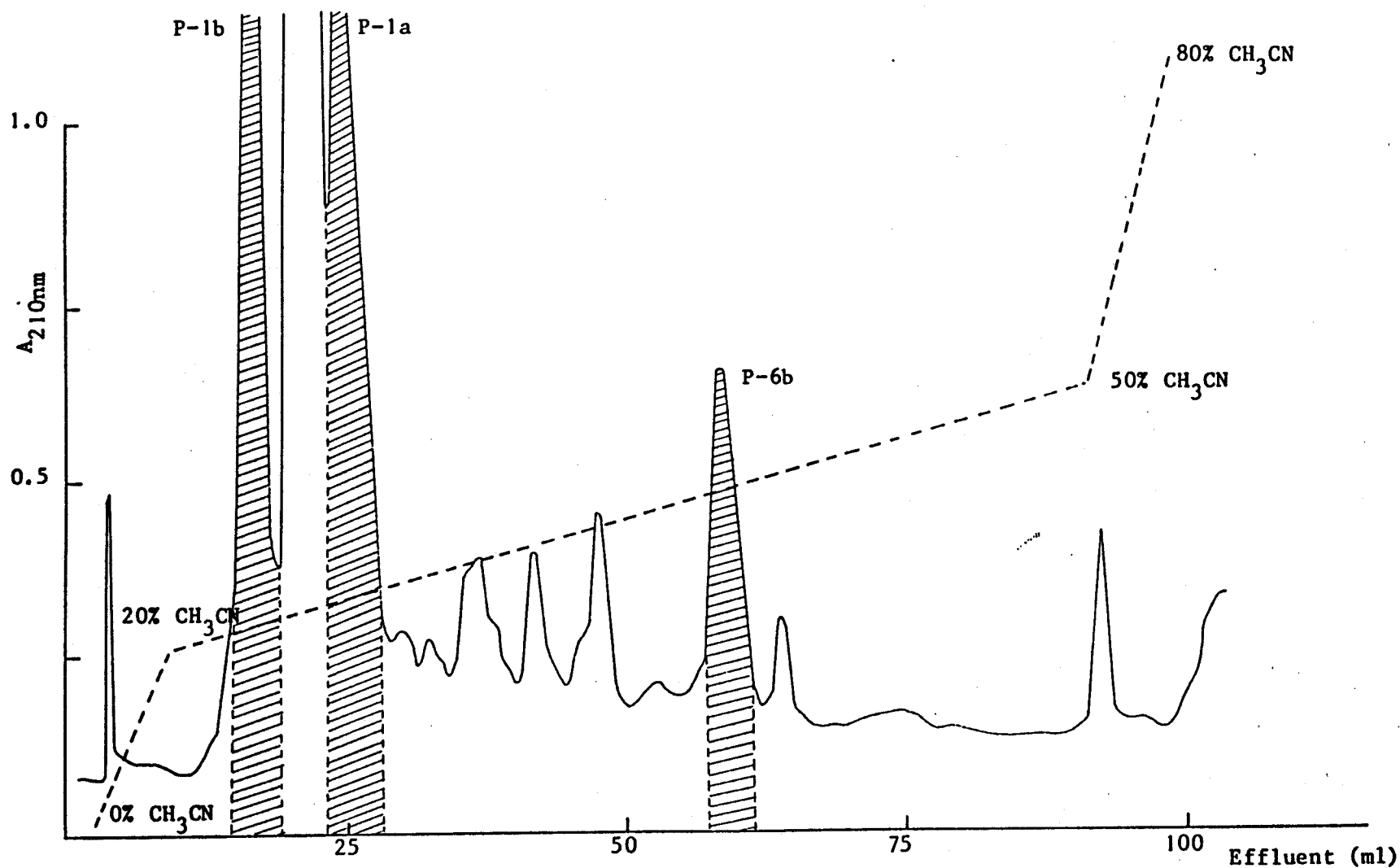


FIGURE 5-A Elution pattern of pepsin peptides from fraction 2 of Fig.4 fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. The C_{18} μ Bondapak column (0.39x30cm) was equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid and eluted with a linear gradient of acetonitrile (----) from 0 to 20%, 5 min ; 20 to 50%, 40 min; 50 to 80%, 5 min. Fractions of 1.2 ml were collected at a flow rate of 2 ml/min. The elution of peptides was monitored at 210 nm. The peptides were numbered according to their position in the sequence of the molecule.

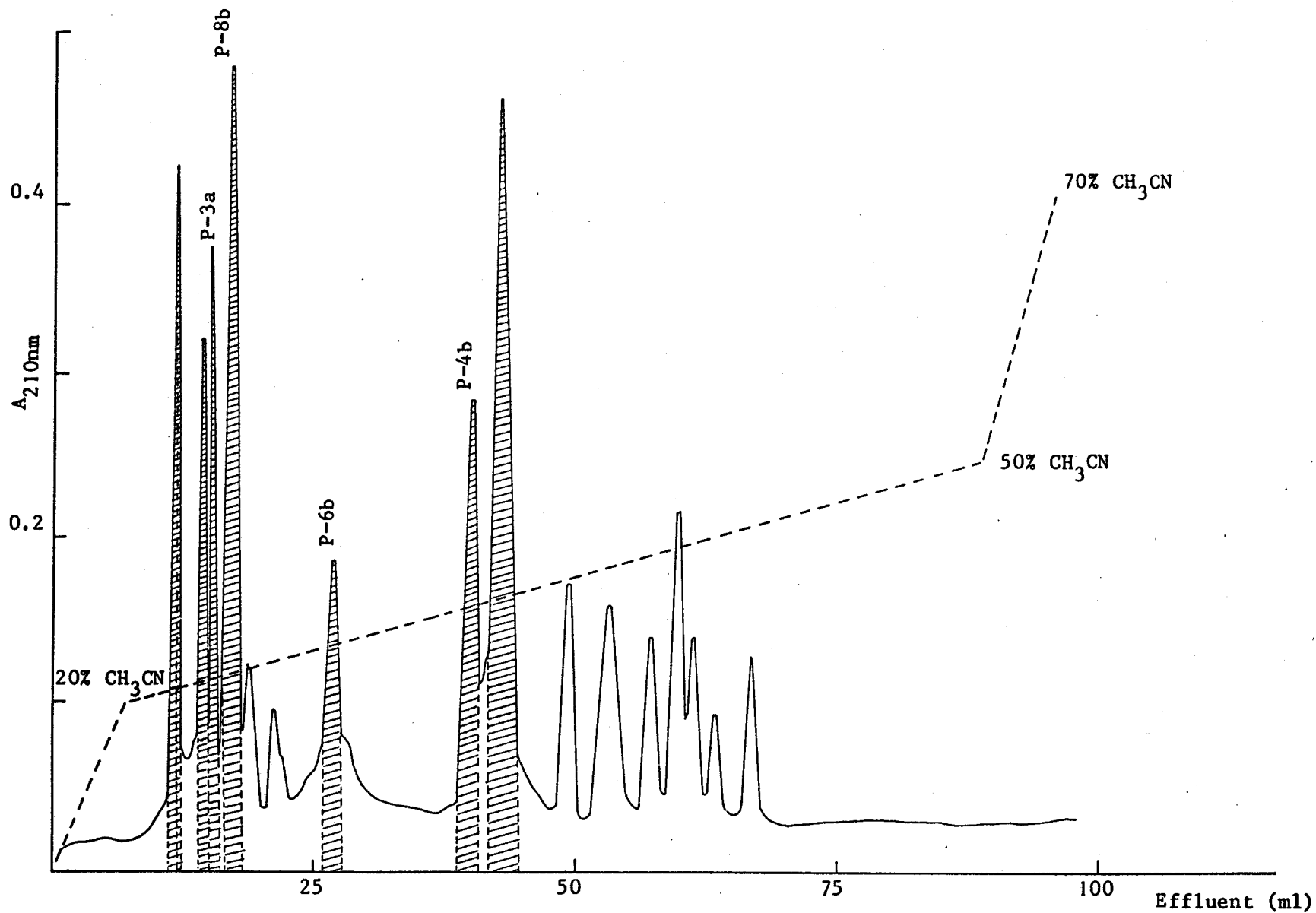


FIGURE 5-B Elution pattern of pepsin peptides from fraction 3 of Fig.4 fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. See legend to Fig.5-A. The conditions were identical except that the final gradient was from 50 to 70% acetonitrile.

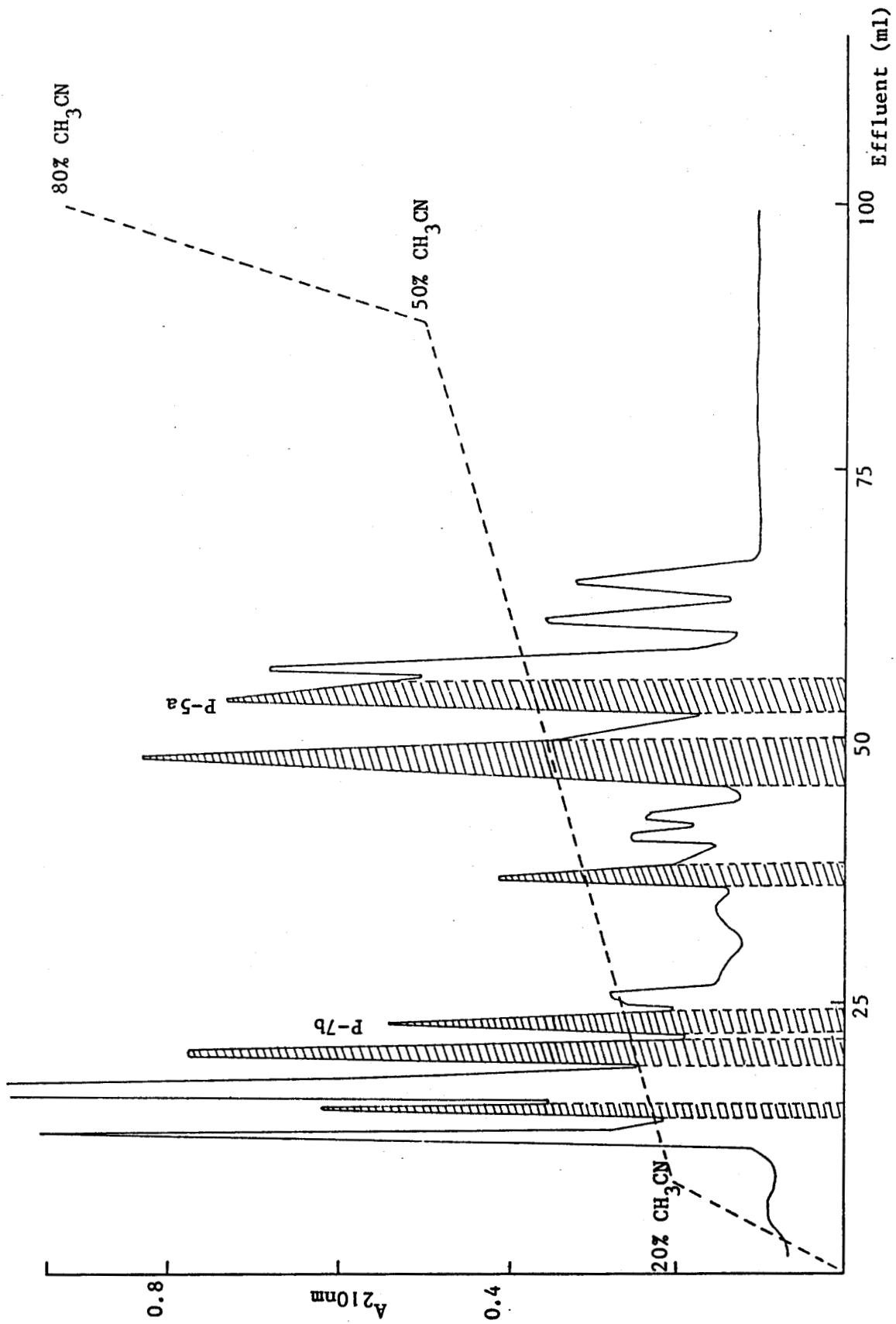


FIGURE 5-C Elution pattern of pepsin peptides from fraction 4 to Fig. 4 fractionated by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. See legend to Fig. 5-A.

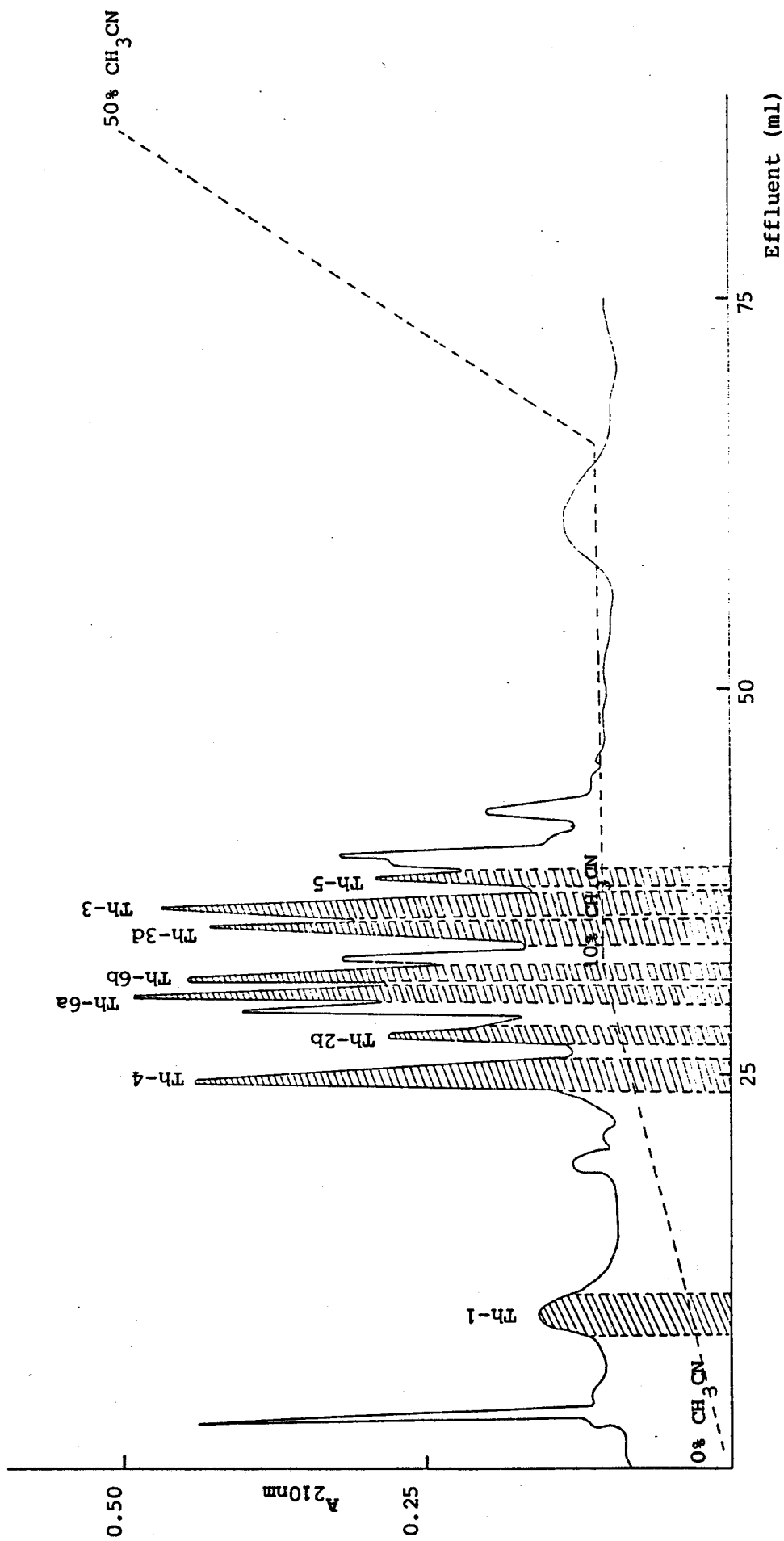


FIGURE 6 Elution pattern of thermolysin peptides from fragment P-9 of *Platymereis* sperm H1. The C18 μ Bondapak column (0.39x30cm) was equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid and eluted with a linear gradient of acetonitrile (----) from 0 to 10%, 5 min; 10%, 15 min and 10% to 50%, 10 min. Collection, elution monitoring and numbering of peptides were performed as indicated in legend to Fig.5-A.

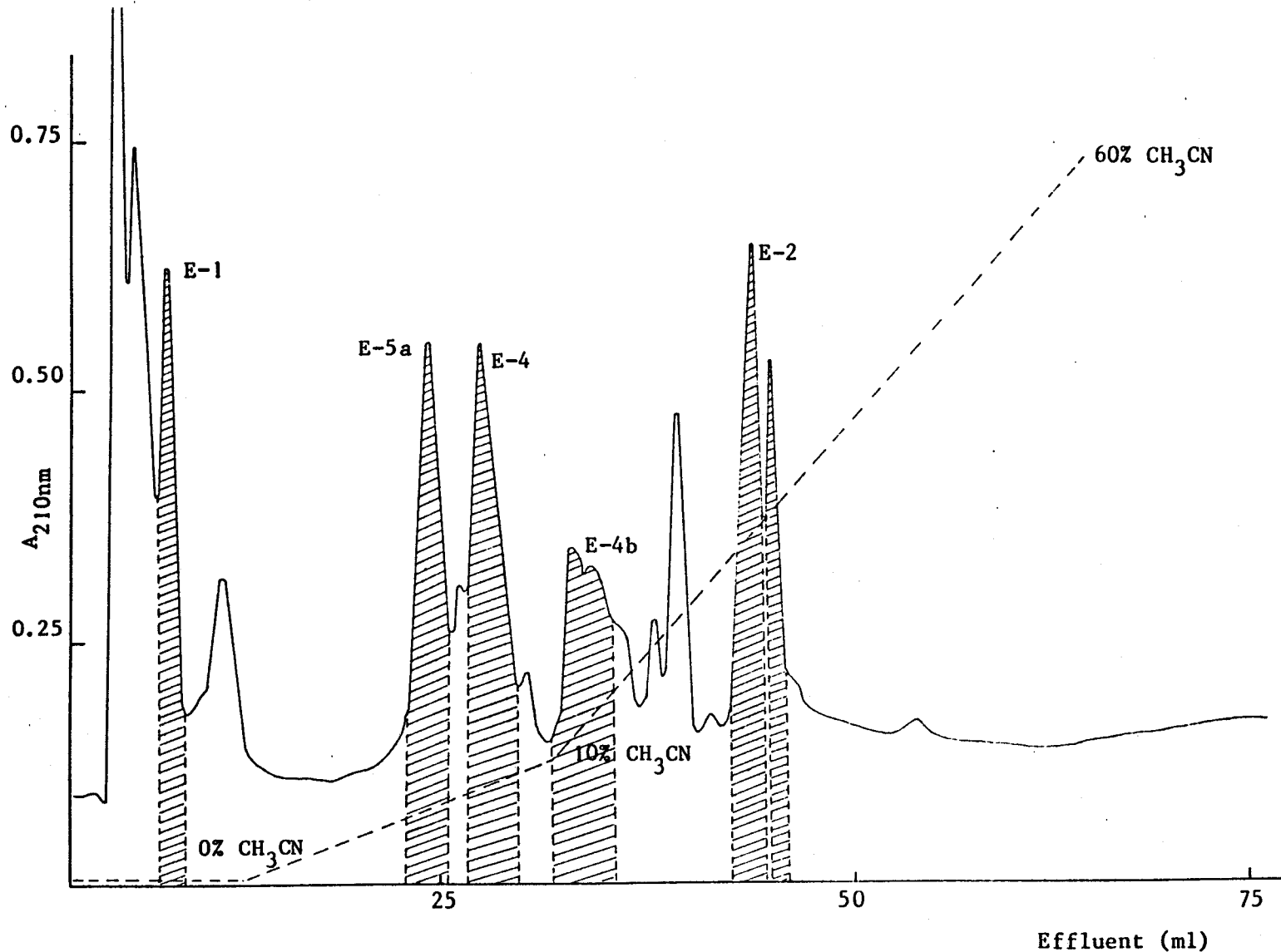


FIGURE 7 Elution pattern of elastase peptides from fragment P-9 of *Platynereis* sperm H1. The C_{18} μ Bondapak column (0.39x30cm) was equilibrated with 0.05% trifluoroacetic acid and was eluted with a linear gradient (----) of acetonitrile : 0% 5 min ; 0 to 10% 10 min and 10 to 60% 30 min. Collection, elution monitoring and numbering of peptides were performed as indicated in legend to Fig.5-A.

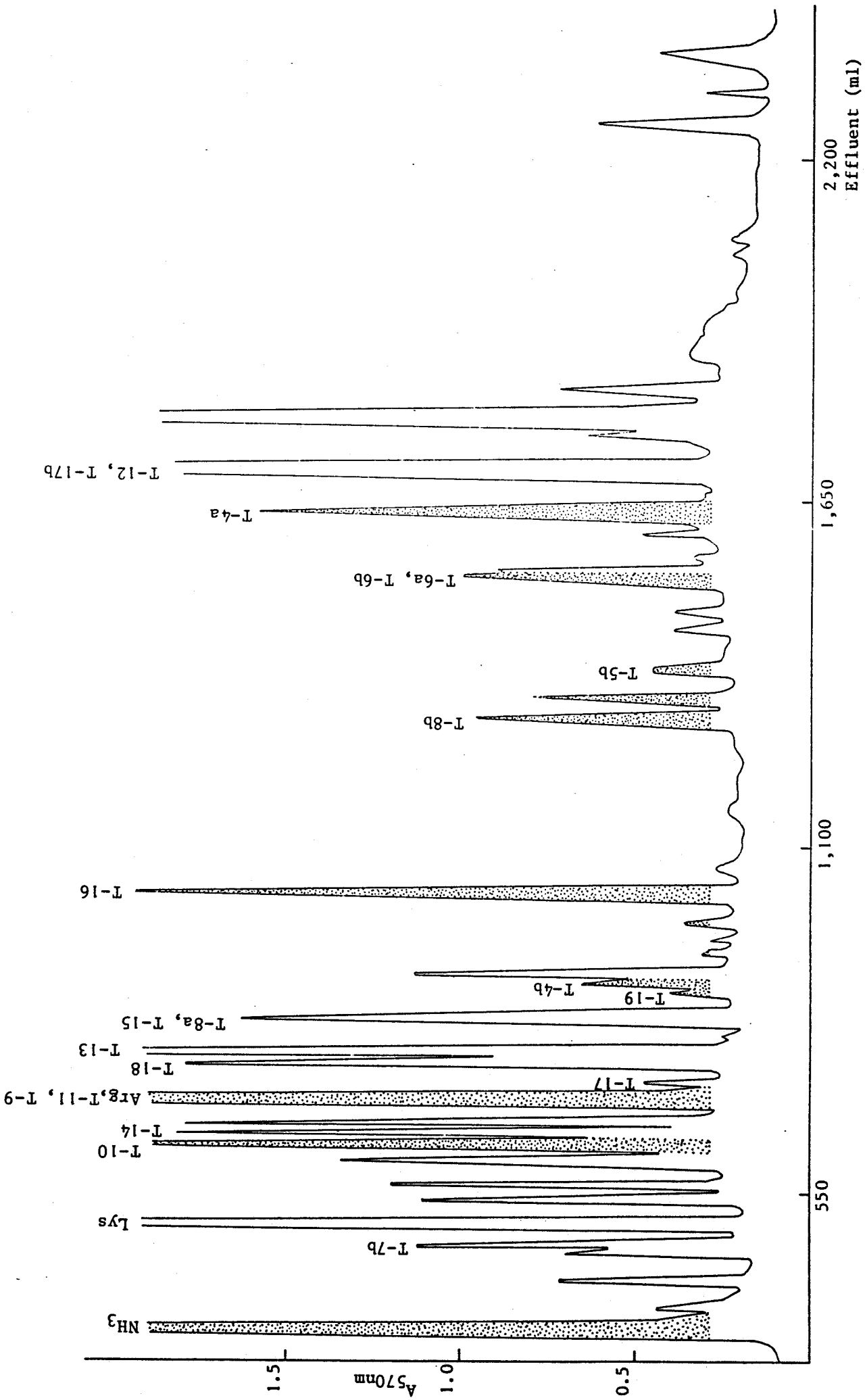


FIGURE 8 Elution pattern of tryptic peptides from the *Platynereis* sperm specific histone H1. The peptides were fractionated on a column of Chromobeads P (60x0.35cm) with pyridine/formate and pyridine/acetate buffers [22]. Fractions of 5.5 ml were collected at a flow rate of 33 ml/h. Dotted peaks correspond to arginine containing peptides. Peptides used for the sequence were numbered according to their position in the sequence of the protein.

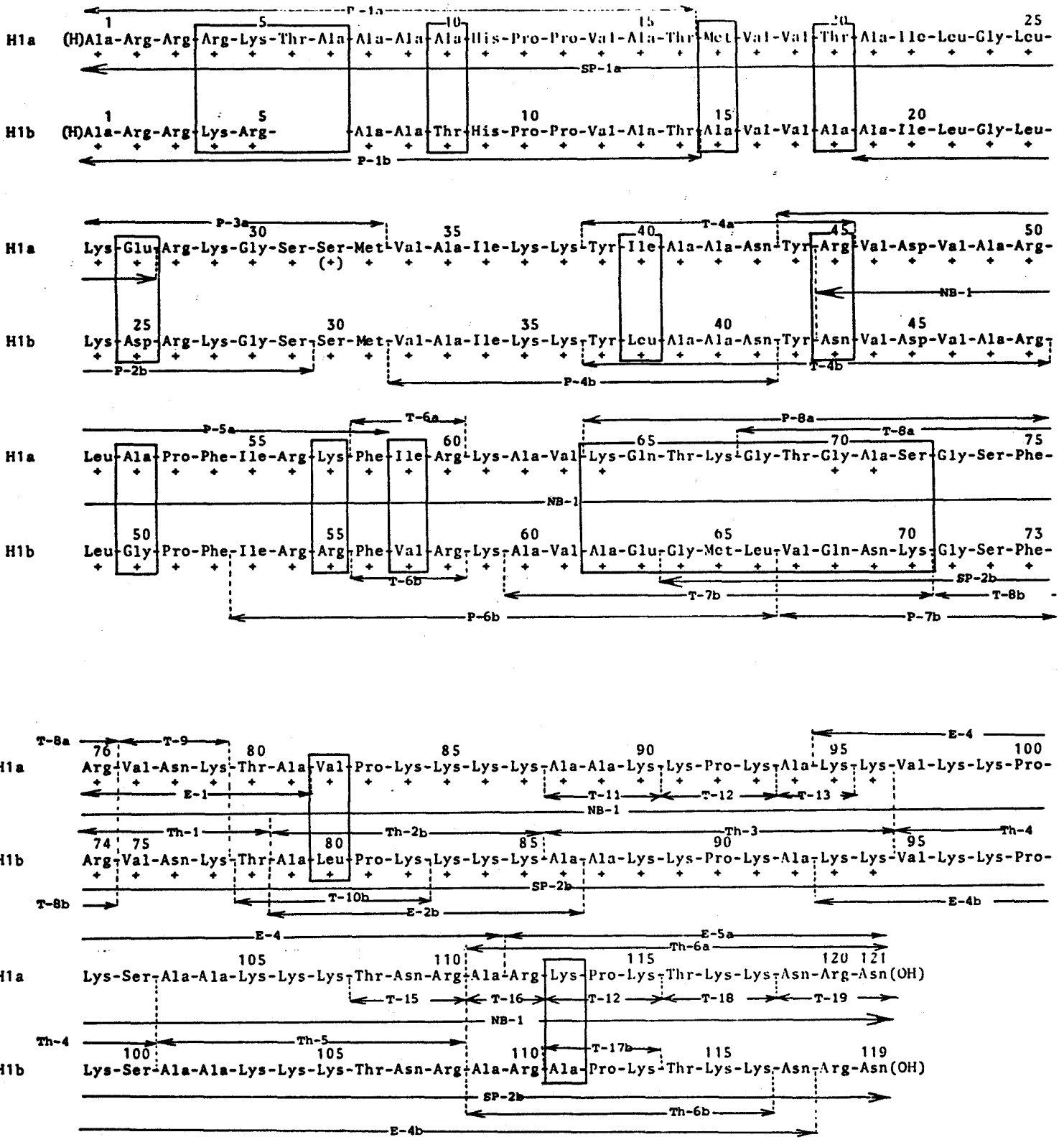


FIGURE 9-A and B Complete amino acid sequences of the two variants H1a and H1b of *Platynereis* sperm histone H1. Methods used for determination of the sequence are indicated as following: +++, automated Edman degradation of the proteins and of their large fragments; , manual Edman degradation; , carboxypeptidase analysis.

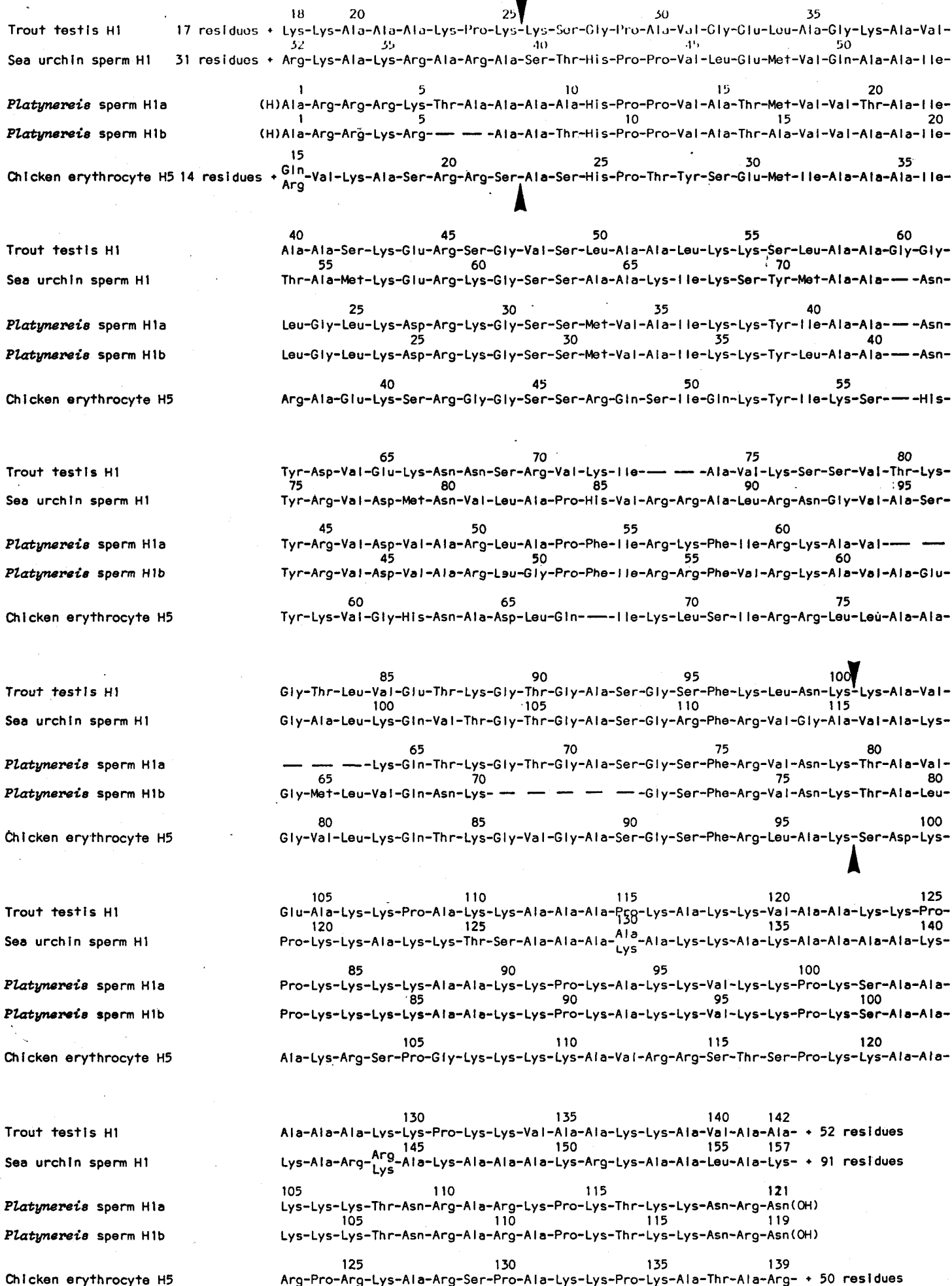


FIGURE 10 Comparison of sequences of histones H1 from trout testis [33], sea urchin [17] and of chicken erythrocyte H5 [31] with the sperm specific H1a and H1b from *Platynereis dumerilii*. The sequences have been aligned for maximum homology. Arrows indicate the limits of the globular domain.

COMMENTAIRE

Les deux variants de l'histone H1 spécifique du sperme de *Platynereis dumerilii* présentent 80% d'homologie de séquence. Les deux séquences diffèrent par une délétion de deux résidus dans H1b et 22 substitutions dont la plupart sont localisées dans la région globulaire hydrophobe (6-83 pour H1a et 6-81 pour H1b). Les deux protéines se différencient au niveau d'une séquence de 9 résidus (64-72 dans H1a, 62-70 pour H1b) adjacente à la séquence Gly-Ser-Phe-Arg(ou Lys) rencontrées chez toutes les histones H1 ou H5 (Fig.18) (MAC LEOD et coll., 1979 ; VON HOLT et coll., 1979 ; YAGUCHI et coll., 1979 ; BRIAND et coll., 1980 ; STRICKLAND et coll., 1980).

La figure 19 donne une idée de la nature de l'hydrophobicité comparée des histones H1 et H5 de cette région en utilisant la représentation simple de CID et coll., 1982.

* La séquence Met-Leu-Val de H1b confère à la région 62-70 de cette protéine un caractère nettement hydrophobe, cette séquence 62-70 de H1b a beaucoup d'homologie avec la séquence 77-85 de l'histone H5.

* La séquence Thr-Gly-Ala-Ser de H1a, plus hydrophile est quant à elle identique aux séquences respectives 105-108 de l'histone H1 de sperme d'Oursin et 90-93 de l'histone H1 du testicule de Truite.

La comparaison de la séquence de ces deux variants fait ressortir ainsi une analogie du variant H1a avec les histones H1 somatiques ou du sperme et une ressemblance du variant H1b à l'histone H5 de l'érythrocyte de Poulet. Cette différence de séquences des variants H1a et H1b est sans doute liée à un rôle particulier de chacun des variants lors de la maturation du sperme. En outre le variant b représente 60 ou 70% de la fraction H1 spécifique, de la même manière l'histone H5 est

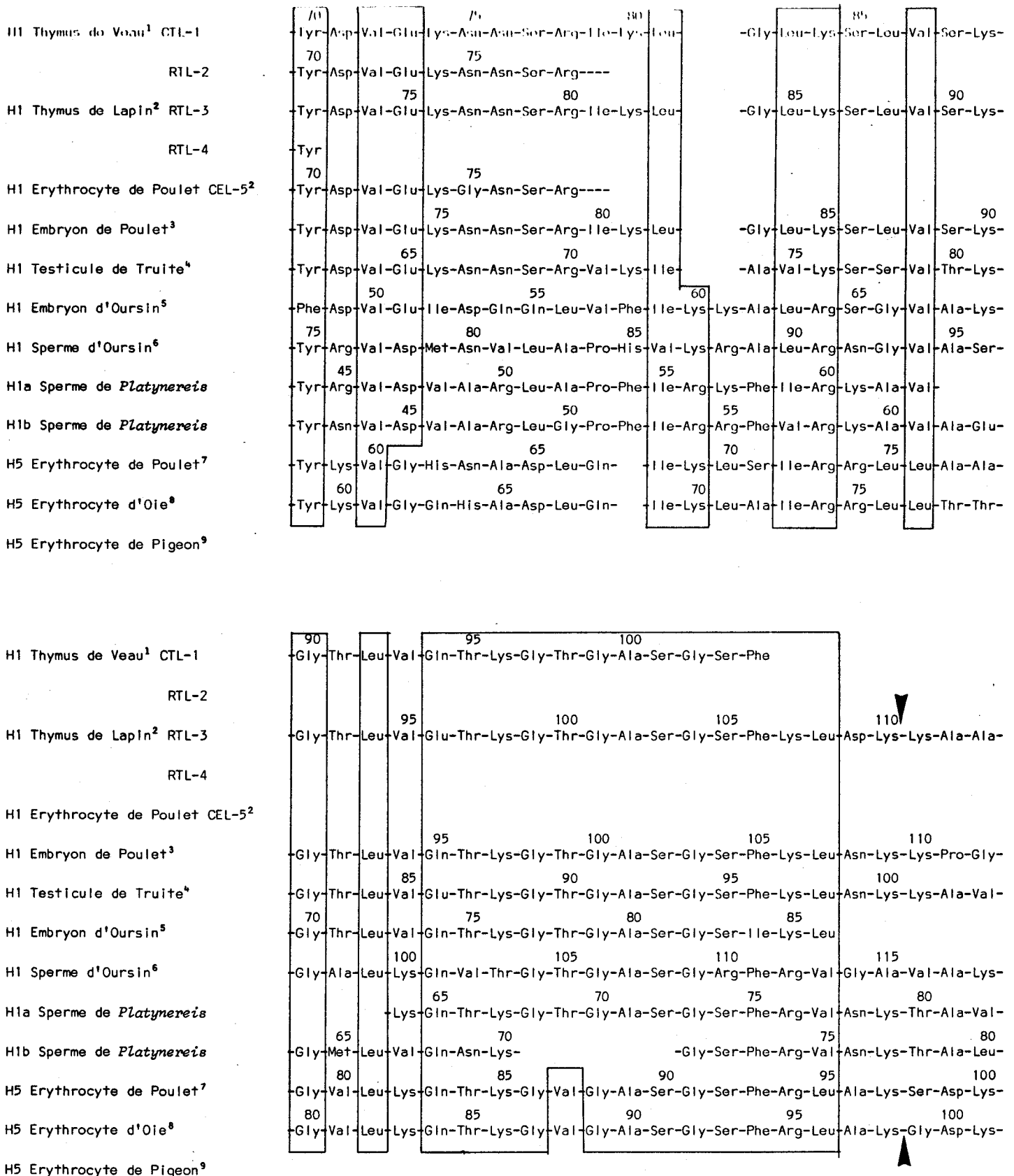


FIGURE 18 (suite) COMPARAISON DES SEQUENCES DE LA REGION GLOBULAIRE DE DIFFERENTES HISTONES H1 OU H5

(Les limites de la zone globulaire sont indiquées par \blacktriangleright . Les cadres indiquent les séquences les plus conservées)

¹LIAO et COLE (1981) ; ²COLE (1977) ; ³SUGARMAN et coll. (1983) ; ⁴MAC LEOD et coll. (1978) ; ⁵SCHAFFNER et coll. (1978) ; ⁶STRICKLAND et coll. (1980) ; ⁷BRIAND et coll. (1980) ; ⁸YAGUCHI et coll. (1979) ; ⁹YAGUCHI et coll. (1977).

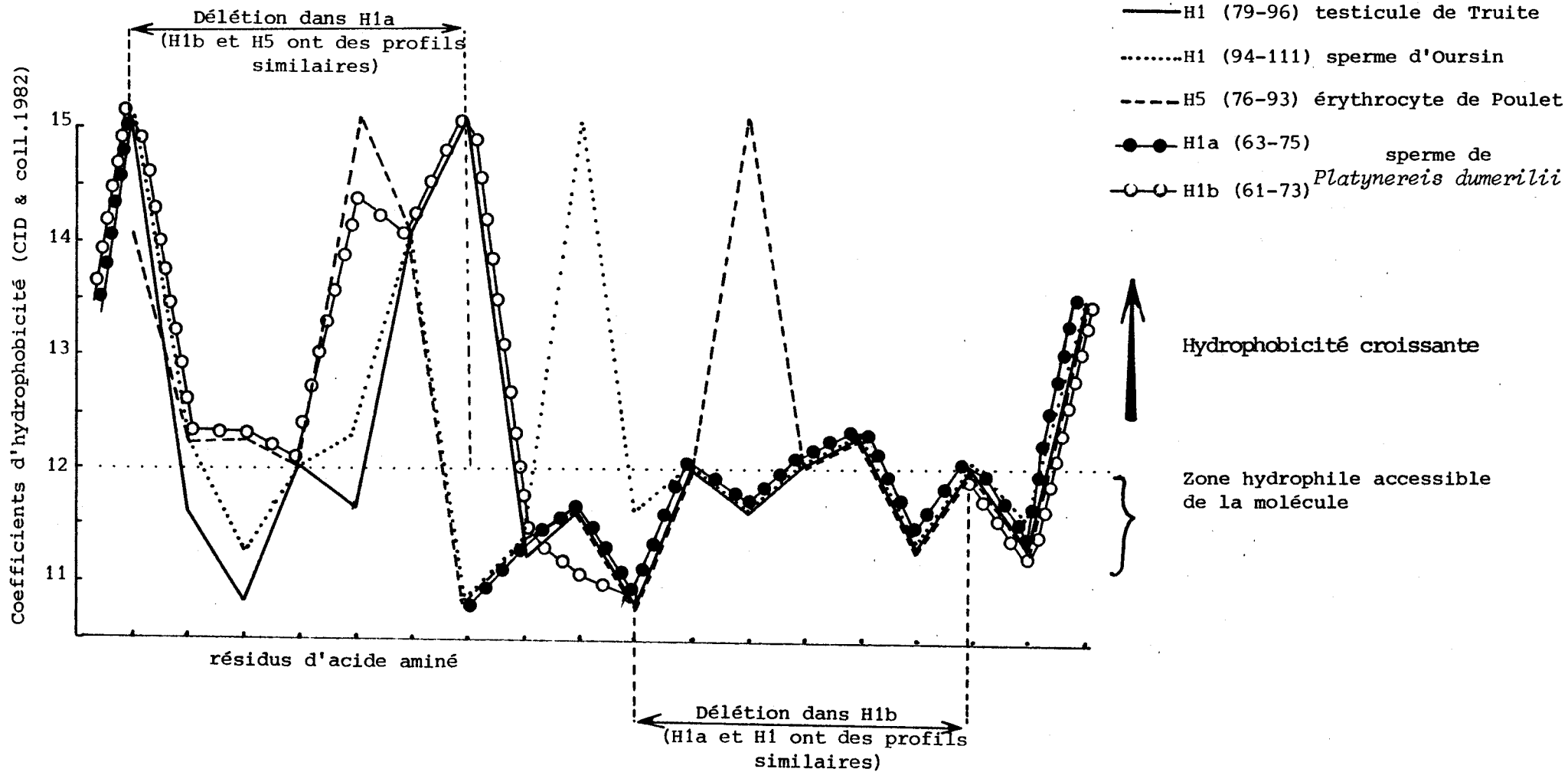


FIGURE 19 HYDROPHOBICITES COMPAREES DES SEQUENCES C-TERMINALES DE LA ZONE GLOBULAIRE DE DIVERSES HISTONES H1

présente au même taux dans la chromatine de l'érythrocyte nucléé mature du Poulet (MAZEN et CHAMPAGNE, 1972). L'homologie structurale dans la zone globulaire de H1b et de H5 semble ainsi correspondre à une homologie fonctionnelle.

La séquence des deux variants de l'histone H1 de *Platynereis* est caractérisée par la répétition de séquences tetrapeptidiques comportant deux résidus basiques :

* la séquence Phe-Ile-Arg-Lys est ainsi répétée deux fois dans H1a (54-57 et 58-61)

* la séquence Ala-Ala-Lys-Lys est présente deux fois dans chacun des variants (88-91 et 103-106 dans H1a ; 86-89 et 101-104 dans H1b)

* la séquence Lys-Pro-Lys-X (dans laquelle X = Ala, Ser ou Thr) est présente trois fois dans H1a (résidus 91-94, 99-102 et 113-116) et deux fois dans H1b (89-92 et 97-100).

Comme toutes les histones de type H1, la molécule comprend 3 domaines distincts : une séquence basique N-terminale (résidus 1-5), un domaine central hydrophobe globulaire (résidus 6-84 dans H1a, 6-83 dans H1b) et une séquence basique C-terminale dans laquelle 20 acides aminés sur les 37 présents sont basiques. La taille de la région globulaire (environ 80 résidus) est remarquablement constante dans les histones H1 (VON HOLT et coll., 1979; BÖHM, 1984) et ceci est lié à la contrainte structurale de la fixation sur le nucléosome (ALLAN et coll., 1980; PUIGDOMENECH et coll., 1983). Le domaine globulaire des histones H1 de sperme est flanqué de deux groupes d'acides aminés basiques qui sont essentiels à la fixation de la protéine au DNA.

La comparaison des séquences des régions globulaires des histones H1 et H5 fait ressortir les points suivants (Fig.18) :

- * une homologie importante entre toutes ses séquences
- * des caractéristiques spécifiques des histones somatiques et des histones du sperme
- * une remarquable analogie entre les histones H1 du sperme et l'histone H5 de l'érythrocyte nucléé du Poulet (VON HOLT et coll., 1979 ; YAGUCHI et coll., 1979; BRIAND et coll., 1980).

C'est ainsi que la séquence His-Pro-Pro(ou Thr) (résidus 11-13 dans H1a, 9-11 dans H1b) est commune aux histones du sperme et à H5, tandis que la séquence homologue Gly-Pro-Pro (ou Ala) n'est présente que dans les histones H1 somatiques (MAC LEOD et coll., 1977; SCHAFFNER et coll., 1978; VON HOLT et coll., 1979; LIAO et COLE, 1981; SUGARMAN et coll., 1983). La séquence Ser-Glu-Met(ou Leu)-Ile(ou Val) est présente dans la plupart des histones H1 et H5, la séquence correspondante dans H1a et H1b de *Platynereis* est Ala-Thr-Met-Val et Ala-Thr-Ala-Val respectivement. La séquence Lys₁₅-Glu-Arg₁₈ de H1a (Lys-Asp-Arg₂₆ de H1b) est commune aux histones H1 somatiques et du sperme. Dans l'histone H5 la séquence correspondante est Lys-Ser-Arg. Les histones H1 du sperme et l'histone H5 de l'érythrocyte nucléé contiennent une séquence de 6 résidus incluant deux résidus de tyrosine (Séquences 39-44 et 37-42 dans H1a et H1b respectivement). Le résidu de tyrosine en position 44 dans H1a et 42 dans H1b est aussi présent dans H1 et H5. Une séquence hydrophile de 13 résidus adjacente au résidu de phénylalanine dans la partie C-terminale du domaine globulaire est très fortement conservée dans toutes les H1 exceptée dans les variants de la H1 de *Platynereis*. Dans les histones H5 la séquence correspondante (résidus 83-95 de la H5 de Poulet) possède un caractère hydrophobe dû à la présence d'un résidu de valine en position 87.

Si la taille du domaine globulaire (80 résidus) est très conservée dans les histones H1, (et nous en avons vu la raison dans les généralités de ce mémoire) il n'en est pas de même pour les extrémités N- et C-terminales basiques, en particulier dans le cas de l'histone H1 de *Platynereis*, l'extrémité N-terminale est anormalement réduite à 5 résidus (37 résidus pour l'histone H1 de sperme d'Oursin) et l'extrémité C-terminale à 37 (129 résidus pour l'histone H1 de sperme d'Oursin) (STRICKLAND et coll., 1980). Il est possible de corréler cette variation dans la longueur des extrémités N- et C-terminales à la longueur du DNA nucléosomique : 245 paires de bases dans la chromatine du sperme d'Oursin, 165 dans la chromatine du sperme de *Platynereis*. La région N-terminale de l'histone H1 porterait selon BÖHM (1984) la spécificité tissulaire de l'histone (Il faut toutefois observer que dans le cas des histones H1a et H1b du sperme de *Platynereis* les deux extrémités N- et C-terminales sont réduites en proportion ; l'extrémité C-terminale, très riche en résidus hydrophiles, se distinguent nettement des autres extrémités C-terminales des histones H1. Elle pourrait tout aussi bien porter une spécificité tissulaire).

RING et COLE (1983), LOSA et coll. (1984) semblent d'accord pour admettre que la condensation des histones H1 dans la chromatine, et la formation de la fibre de 30 nm de diamètre nécessite à la fois la zone globulaire et la région C-terminale basique de l'histone. La région N-terminale serait moins impliquée dans ce processus. ALLAN et coll. (1980) avaient montré que la région globulaire à elle seule ne suffit pas pour former la superstructure polynucleosomique. La chromatine du sperme de *Platynereis dumerilii* apparaît hautement condensée, cette extrême condensation ne peut être uniquement due à l'histone H1 spécifique mais aussi aux protamines présentes dans cet organisme. Il sera très intéressant d'établir la responsabilité de chacune des classes de protéines dans le

phénomène de condensation. La structure nucléosomique est présente dans la chromatine du sperme de *Platynereis*; Daniel SELLOS met en évidence outre la sous-unité nucléosomique renfermant 165 paires de bases de DNA, des zones de DNA libres, non complexées aux histones. Les protamines pourraient interagir avec le DNA au niveau de ces régions, diminuant ainsi le nombre des charges phosphate et permettant le rapprochement des fibres de DNA.

L'analogie remarquable des zones globulaires des histones H1 du sperme et H5 peut enfin attirer l'attention sur certaines autres analogies entre les types de cellules (spermatozoïdes et érythrocytes) qui les abritent, par exemple :

* une origine embryonnaire commune des cellules primordiales de la lignée érythrocytaire et de la lignée germinale (cytotrophoblaste et mésenchyme)

* une maturation analogue lors de la différenciation de ces cellules primordiales après invasion de tissus comme la moelle (lignée rouge), le testicule (spermatozoïde) dont l'origine embryonnaire est l'endoderme.

* une extrême condensation de leur chromatine qui ne possède plus d'expression des gènes.

- Pour l'érythrocyte ce phénomène va jusqu'à l'expulsion de noyau au sortir de la moelle chez les mammifères supérieurs. En contre partie la durée de vie de ce type de cellule spécialisée est limitée à 100 jours.

- Pour le spermatozoïde la compaction de la chromatine protégerait celle-ci lors des événements de la fécondation (externe ou interne). Mais là aussi sa durée de vie est limitée jusqu'au transfert de son matériel génétique.

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- BÖHM, L. (1984)
Proteases as structural probes for chromatin : the domain structure of histones.
Bioscience Reports 4, 365-386.
- BRIAND, G., KMIĘCIK, 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-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence.
FEBS Letters 112, 147-151.
- CID, H., BUNSTER, M., ARRIAGADA, E. and CAMPOS, M. (1982)
Prediction of the secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles.
FEBS Letters 150, 247-254.
- COLE, R.D. (1977)
in "The molecular biology of the mammalian genetic apparatus" (Ts'o P.O.P. ed.) Vol.1 pp 93-104, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York.
- LIAO, L.W. and COLE, R.D. (1981)
The amino acid sequence of residues 1-104 of CTL-1, a bovine H1 histone.
J.Biol.Chem. 256, 3024-3029.
- LOSA, R., THOMA, F. and KOLLER, T. (1984)
Involvement of the globular domain of histone H1 in the higher order structure of chromatin.
J.Mol.Biol. 175, 529-551.
- MAC LEOD, A.R., WONG, N.C.W. and DIXON, G.H. (1977)
The amino acid sequence of trout-testis histone H1.
Eur.J.Biochem. 78, 281-291.
- MAZEN, A. and CHAMPAGNE, M. (1972)
Histones d'érythrocytes de Poulets.
IV - Etude quantitative des histones au cours de la maturation des érythrocytes.
Biochimie 54, 1273-1279.
- PUIGDOMENECH, P., JOSE, M., RUIZ-CARILLO, A. and CRANE-ROBINSON, C. (1983)
Isolation of a 167 base pair chromatosome containing a partially digested histone H5.
FEBS Letters 154, 151-155.

- RING, D. and COLE, R.D. (1983)
Close contacts between H1 histone molecules in nuclei.
J.Biol.Chem. 258, 15361-15364.
- SCHAFFNER, W., HUNZ, G., DAETWYLER, H., TELFORD, J., SMITH, H.O.
and BIRNSTIEL, M.L. (1978)
Genes and spacers of cloned sea urchin histone DNA ana-
lysed by sequencing.
Cell 14, 655-671.
- STRICKLAND, W.N., STRICKLAND, M., BRANDT, W.F., VON HOLT, C.,
LEHMANN, A and WITTMANN-LIEBOLD, B. (1980)
The primary structure of histone H1 from qperm of the
sea urchin *Parachinus angulosus* 2. Sequence of the C-ter-
minal CNBr-Peptide and the entire primary structure.
Eur.J.Biochem. 104, 567-578.
- SUGARMAN, B.J., DODGSON, J.B. and ENGEL, J.D. (1983)
Genomic organization, DNA sequence and expression of
chicken embryonic histone genes.
J.Biol.Chem. 258, 9005-9016.
- VON HOLT, C., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F. and STRICKLAND, M.S.
(1979)
More histone structures.
FEBS Letters 100, 201-218.
- YAGUCHI, M., ROY, C., DOVE, M. and SELIGY, V. (1977)
Amino acid sequence homologies between H1 and H5 histones.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 76, 100-106.
- YAGUCHI, M., ROY, C. and SELIGY, V.L. (1979)
Complete amino acid sequence of goose erythrocyte H5
histone and the homology between H1 and H5 histones.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 90, 1400-1406.

PERSPECTIVES

Les séquences en acides aminés des protamines d'Invertébrés marins ne sont pas connues. C'est pourquoi nous avons l'intention de déterminer les structures primaires des deux protamines présentes dans le sperme de *Platynereis*. Cette étude nous permettra d'établir des comparaisons intéressantes avec les protamines de Vertébrés (Poissons, Mammifères) actuellement bien connues. En complément une étude structurale de la chromatine du sperme de *Platynereis* pourrait être envisagée en particulier la visualisation des histones H1 spécifiques (et des protamines) au sein de la chromatine au moyen d'anticorps. Toutefois ce projet reste soumis à la nécessité d'obtenir un étalement de la chromatine du sperme or cela est rendu très difficile par l'extrême compaction de ce matériel.

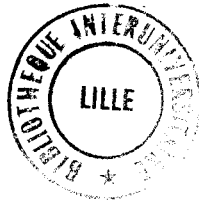
La chromatine de l'érythrocyte nucléé du Siponcle ne renferme pas d'histone H5 mais par contre nous avons isolé une histone de type H1°. Une étude de cette molécule nous permettra de compléter les acquisitions récentes dans le domaine des histones H1° dont l'apparition est fonction de l'état de différenciation de la cellule.

La détermination de la séquence de l'histone H2A de l'érythrocyte de Siponcle clôt une série d'études consacrées aux histones H2A et H2B d'Invertébrés marins entreprises au laboratoire. Ces études ont permis de préciser les zones variables et conservées de la séquence de ces molécules et de déterminer la zone d'H2A (résidus 18-118) en interaction avec H2B. Dans le domaine des eucaryotes primitifs (levures, champignons) les histones H2A et H2B sont peu connues ; chez un myxomycète *Physarum polycephalum* très étudié en raison de la synchronisation naturelle des divisions cellulaires, les histones H2A et H2B apparaissent très variables ; l'histone H2A en particulier est prolongée de 40 résidus du côté N-terminal (caractéristiques partagées avec les histones H2A du germe de Blé). Nous avons l'intention d'étudier cette molécule, l'étude de l'histone H2B est actuellement en cours et montre une forte variabilité de la région N-terminale.

"Vous n'aurez pas besoin de me le dire deux fois ; je suis bien pénétré de toute l'utilité de cette méthode : car, quand on a mis du noir sur du blanc, on rentre chez soi tout à fait soulagé."

L'écolier

GOETHE "Faust" (Cabinet d'Etude)



Cette thèse a été imprimée
par l'ASSOCIATION CORPORATIVE DES
ETUDIANTS EN MEDECINE
DE LILLE
A. C. E. M. L.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

La séquence en acides aminés des 123 résidus de l'histone H2A de l'érythrocyte nucléé de Siponcle (*Sipunculus nudus*) a été déterminée. Comparée à l'histone homologue du thymus de Veau, l'histone H2A de l'érythrocyte de Siponcle présente 6 délétions et 13 substitutions dont 6 ne sont pas conservatives. La plupart de ces modifications sont situées dans les extrémités N- et C-terminales basiques, sites privilégiés d'interaction avec le DNA. La région centrale (18-118) qui interagit avec l'histone H2B dans le complexe H2A-H2B ne recèle que quelques modifications de nature conservative. L'histone H2A de l'érythrocyte de Siponcle est phosphorylée à un taux de 60% sur le résidu de sérine en position N-terminale. Cette observation pourrait être en rapport avec l'inactivation de la chromatine de l'érythrocyte.

La chromatine du sperme de *Platynereis dumerilii* (Annélide Polychète) est caractérisée par la présence d'une histone H1 spécifique et de deux protamines à côté des histones de type somatique. L'histone H1 spécifique est constituée de deux variants H1a et H1b qui présentent une forte homologie structurale.

La comparaison des séquences en acides aminés des deux variants de l'histone H1 (H1a, 121 résidus ; H1b, 119 résidus) a permis de mettre en évidence la présence de deux délétions dans l'histone H1b et de 22 substitutions dont la plupart sont situées dans le domaine globulaire. Les deux variants H1a et H1b diffèrent particulièrement au niveau d'une séquence de 9 résidus d'acides aminés située au voisinage du résidu de phénylalanine conservé chez toutes les histones H1 (64-72 dans H1a ; 62-70 dans H1b). Comparées aux autres histones H1, H1a et H1b ont une taille moléculaire exceptionnellement réduite, cependant leur domaine globulaire (80 résidus) est similaire à celui des autres histones H1 de type somatique ou spécifiques du sperme. La comparaison des séquences des zones globulaires de H1a et de H1b montre une forte homologie entre H1a et les histones H1 somatiques ou du sperme alors que H1b est plus proche de l'histone H5 de l'érythrocyte nucléé du Poulet.

MOTS CLEFS : Invertébrés marins - Érythrocytes nucléés - Spermatozoïdes - Histones - Variants - Protamines - Structure primaire - Phosphorylation.