

FRACTIONNEMENT DES HISTONES

I - Fractionnement par extraction différentielle

II - Fractionnement par précipitation sélective

Etude bibliographique

Jean-Claude AUTRAN

1972

Institut National de la Recherche Agronomique
Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés
16 rue Nicolas-Fortin, PARIS 13°

FRACTIONNEMENT DES HISTONES

1^o partie:

FRACTIONNEMENT PAR EXTRACTION DIFFERENTIELLE

Les méthodes les plus classiques de préparation de l'histone, quel que soit le matériel de départ (chromatine brute, noyaux isolés, nucléohistone), consistent en une extraction à basse température, par un acide dilué: HCl ou H₂SO₄.

Quelques auteurs ont recherché à quelles conditions l'extraction acide de l'histone était quantitativement réalisée. BUTLER et al. (1954) signalent déjà qu'en présence d'un acide très dilué (H₂SO₄ 0,1N) seule une fraction de l'histone totale est extraite et qu'alors, il est nécessaire d'employer H₂SO₄ 0,25N ou même 0,5N et d'opérer des extractions répétées pour obtenir la totalité de l'histone.

La plupart des travaux constatent ainsi que les différentes fractions de l'histone n'ont pas la même affinité pour l'ADN. On pense donc que dans la DNP native, certaines fractions sont liées moins fortement que d'autres à l'ADN: la fraction très riche en lysine (lys./arg. > 10) serait ainsi la plus facile à extraire à partir de la DNP.

Les tentatives d'extraction sélective des différentes fractions d'histones ont pu être effectuées en faisant appel à deux types de principes:

-Les uns ont préféré travailler en milieu acide mais en jouant soit sur la nature de l'acide, soit sur la concentration ou le pH. Dans ce dernier cas, on a traité parallèlement différents échantillons à des pH différents ou bien un même échantillon, successivement à des pH décroissants.

-D'autres ont utilisé la propriété de dissociation des DNP en milieu salin et ont essayé d'extraire différentes fractions d'histones en espérant une dissociation progressive tout en demeurant à pH neutre. Ces procédés présentent sur les méthodes utilisant les acides, l'avantage de ne pas dégrader la DNP résiduelle et de permettre par exemple, des travaux recherchant sa capacité à servir de "template" pour la synthèse de l'ARN (GEORGIEV, ANANIEVA et KOZLOV 1966) ou des études de conformation moléculaire.

Dans tous les cas, le fractionnement est donc déterminé à la fois par la force des liaisons entre les différentes histones et l'ADN, et par les propriétés de solubilité des histones dissociées dans le solvant d'extraction.

Le matériel de départ pour l'extraction sélective des histones peut être soit la nucléohistone purifiée, soit des préparations de noyaux isolés ou de chromatine, soit simplement, le tissu lavé plusieurs fois par une solution saline 0,14M et parfois par l'éthanol. (Voir chapitre sur l'extraction des histones totales).

Lorsque le tissu étudié présente une grande richesse en constituants nucléaires - c'est le cas du thymus de veau - il est inutile d'isoler la DNP; les auteurs travaillent généralement sur le tissu, après quelques lavages par NaCl 0,14M. Il arrive cependant, que des fractions protéiques "non-histones" soient obtenues à partir d'un tel matériel brut. C'est ce que constate JOHNS (1960) ^{et coll.} dans des extraits éthanol-HCl, ainsi que MURRAY (1966) dans les extraits acides de pH < 4.

Par contre, lorsque le matériel est plus pauvre en DNP ou, parallèlement riche en protéines cytoplasmiques, protéines de réserves ou impuretés diverses, il est nécessaire de travailler sur des préparations purifiées de noyaux, de chromatine ou de DNP. C'est le cas, généralement, des tissus végétaux.

~~L'avantage de ce procédé vient à la fois de la dissociation de l'histone/ADN et des solubilités différentes des quelques sels d'histones dans l'éthanol et l'acétone.~~

~~Fractionnement en milieu acide:~~

~~a) Par concentrations croissantes d'acide à partir des DNP (isolées ou non) à l'état précipité:~~

~~Contrairement à LAURENCE ^{et coll} (1963) qui ne trouvait pas de différence qualitative entre les extraits successifs opérés par HCl 0,25N, VENDRELY (1966) constate que HCl 0,1N, utilisé en premier lieu pour extraire l'histone, opère une extraction sélective de certaines fractions; il le montre à l'aide d'électrophorèse amidon à pH 2,2 et 6,86 et constate que si la fraction P_I riche en lysine peut être totalement obtenue par HCl 0,1N, d'autres fractions sont déjà extraites partiellement, à cette~~

I -

FRACTIONNEMENT EN MILIEU ACIDE

- a) Par concentrations croissantes d'acide (HCl ou H₂SO₄), à partir de la DNP isolée ou non, à l'état solide:

Contrairement à LAURENCE (1963) qui ne trouve pas de différences qualitatives entre des extraits successifs par HCl 0,25 N, VENDRELY (1966) constate que l'emploi d'une plus faible concentration d'acide (HCl 0,1 N) en premier lieu, opère une extraction fractionnée. Il le montre à l'aide d'électrophorèse en gel d'amidon à pH 2,2 et 6,86 mais constate que si la fraction F_I (riche en lysine) peut être totalement obtenue par HCl 0,1 N, d'autres fractions sont déjà extraites partiellement à cette concentration. Donc, si HCl 0,1 N extrait totalement F_I, il n'y a cependant pas extraction sélective de cette fraction.

Le rendement des extractions successives, pour les histones de thymus de veau, est le suivant, d'après VENDRELY (1966):

Concentrations acides successives	% d'histone recueillie	Composition probable de l'extrait
0,1 N	65,5%	F _I + F ₂ + F ₃
0,25 N	22,3%	F ₂ + F ₃
0,5 N	12,2%	F ₃

RASMUSSEN et coll. (1962) obtiennent également deux fractions différentes d'histones en extrayant successivement la DNP par H₂SO₄ à pH 1,5 (fraction A:60%) puis à pH 0,7 (fraction B:40%). En particulier, l'histone B ne contient pas les composants du groupe chromatographique I (riches en lysine) tandis que l'histone A possède des fractions I, II et III-IV.

L'avantage de ce système est de pouvoir, à partir d'un matériel brut, obtenir une histone A peu contaminée et aisément fractionnable car isolée à un pH peu acide, tandis que la fraction B (ou bien l'histone totale obtenue par une seule extraction à pH 0,7) s'avère très contaminée et difficile à chromatographier.

4

L'auteur préfère donc ici à une histone totale mais contaminée, une préparation A non totale mais qui contient néanmoins (dans des proportions sans doute différentes) tous les composants de l'histone totale, ce qui permet l'isolement à l'état pur de chacun d'eux.

b) Par titrage à l'aide d' H_2SO_4 , à différents pH, d'une suspension aqueuse de thymus de veau (lavé par NaCl 0,14 M)

MURRAY (1966, 1969) étudie ainsi l'influence du pH sur l'extraction des histones de thymus. Les suspensions amenées à des pH compris entre 4 et 0,5 libèrent chacune des histones plus ou moins complètes qui sont étudiées ensuite par chromatographie (Amberlite IRC 50) ou électrophorèse en gel d'amidon. L'auteur opère aussi parfois des extractions successives en abaissant progressivement le pH d'un même échantillon.

Il est constaté que les fractions correspondant aux pics Ia et Ib de chromatographie (c.a.d. les fractions riches en lysine) sont enlevées les premières entre pH 2,6 et pH 1,75, aucune histone n'étant extraite à $pH > 2,6$.

Les autres fractions sont extraites à des pH inférieurs, mais non de façon sélective: en effet, à partir de pH 1,6, les fractions IIb, III et IV (lys/arg = respectivement 1,7; 0,7 et 0,7) sont extraites simultanément.

Une fraction appelée IIIa* (lys/arg = 0,9) n'est obtenue qu'au dessous de pH 1,2 et l'extraction de l'histone n'est complète qu'à pH 0,7 ou 0,6.

Cela confirme dans une certaine mesure les travaux de Satake et coll. (1960) et de Bijvoet (1957) qui constate l'extraction quasi quantitative des histones riches en lysine à pH 1,5, mais dans un état légèrement contaminé par d'autres fractions.

MURRAY (1968), travaillant sur les histones d'érythrocytes de poulet arrive à des considérations analogues sur ce tissu, mais obtient un fractionnement plus satisfaisant qu'avec l'histone de * thymus. L'auteur constate ainsi que l'extraction des histones ne commence qu'à pH 2,8 et est totale à pH 1,02. Le choix judicieux des pH d'extraction permet en outre d'isoler à l'état pur une fraction qui est justement l'histone spécifique des érythrocytes aviaires. De plus, les fractions III et IV considérées auparavant comme absentes

des érythrocytes de poulet sont trouvées dans les extraits à pH 1,02.

JOHNSON et coll. (1964) observent également qu'à partir d'une suspension de noyaux de thymus, un acide fort peut extraire l'histone totale, mais dans un état peu propice à un fractionnement sur Séphadex à cause de la prédominance des grosses molécules qui masquent totalement les autres. Il semble donc préférable d'effectuer au moins deux extraits successifs (pH 1,8 puis pH 1,35 par ex.) pour déceler toutes les fractions d'histone. Les auteurs ne signalent cependant pas si les poids moléculaires élevés trouvés, par tamisage moléculaire, dans les extraits d'acides forts correspondent à des histones natives ou si ce sont des artefacts créés par l'agrégation de fractions histones à pH très acide.

Chez les tissus végétaux, le seul exemple de fractionnement acide est, à notre connaissance, pratiqué par DICK (1968) à partir de noyaux de racines de *Vicia faba*, selon la méthode de MURRAY (1965, 1966). Les résultats confirment ceux obtenus par Murray chez le thymus: aucune histone n'est extraite à pH 2,8 et, à l'exception des fractions riches en lysine obtenues à pH 1,8, le procédé ne permet pas l'isolement sélectif d'autres fractions de l'histone. L'auteur souligne cependant l'utilité de cette méthode pour ^{effectuer} un premier fractionnement grossier ou pour permettre des comparaisons entre extractions biochimiques et cytochimiques.

* La fraction IIa a été identifiée par la suite à un agrégat de IIb, III et IV. Ce n'est donc pas une vraie fraction.

c) Par l'emploi d'acides autres que HCl ou H₂SO₄

Dès 1954, Davison et Butler ont extrait de la DNP de thymus une histone très riche en lysine à l'aide d'acide citrique 0,2N tandis que Daly et Mirsky 1955 employaient l'acide citrique 0,05 M en présence de NaCl 0,5 M.

Plus tard, l'acide perchlorique 5% a été proposé par Johns et Butler (1962) et Butler (1964) pour extraire aussi la fraction riche en lysine. C'est la première méthode connue d'extraction quantitative d'une fraction de l'histone sans isolement préalable de l'histone totale.

Des observations semblables ont été faites par Bigwood

(1959) et plus tard DE NOOÏ et Westembrink (1962) qui préconisent l'acide trichloracétique 5% pour extraire les mêmes histones riches en lysine du thymus de veau.

L'acide perchlorique 5% ou l'acide trichloracétique 5% sont utilisés indifféremment par CHAMPAGNE et MAZEN (1968) pour extraire aussi l'histone F_I à partir de nucléoprotéine d'érythrocytes de poulet.

De l'emploi des différents acides signalés pour tenter d'extraire sélectivement les histones, nous pouvons déjà déduire les considérations suivantes:

1) L'aisance constatée à extraire les histones est inversement proportionnelle au nombre de liaisons ioniques à défaire.

2) La complexité des extraits d'histones est proportionnelle à la concentration de l'acide utilisé.

3) Seules les fractions riches en lysine F_I (ou I ou Ia + Ib) peuvent être détachées de la DNP sans extraire notablement les autres fractions. Plusieurs moyens existent pour cela: par exemple: extraction par $HClO_4$ 5%, CCl_3COOH 5%, acide citrique et HCl ou H_2SO_4 entre pH 2,7 et pH 1,5.

4) Tous les auteurs ont constaté l'impossibilité d'extraire sélectivement les fractions autres que F_I , par l'emploi d'acides seuls, ce qui a conduit l'équipe de Johns à conjuguer à l'action de HCl, celle de l'éthanol.

d) Extraction sélective par l'éthanol-HCl.

Dès 1960, Johns et coll. étudient l'influence sur l'extraction des différentes fractions de l'histone de thymus, de plusieurs concentrations en éthanol (de 0 à 98%) dans un mélange avec HCl, à concentration constante (0,25 N) de ce dernier.

Les auteurs constatent que si pour 0% d'éthanol on obtient bien une histone totale et si pour 10% d'éthanol, on obtient encore une histone complexe avec prédominance des fractions riches en lysine par contre pour 70-80% d'éthanol (dans HCl 0,25 N) on solubilise essentiellement des fractions riches en arginine.

Une dialyse contre l'éthanol de l'extrait obtenu permet de recueillir un précipité particulièrement riche en arginine et

7

pratiquement identique (pour ses A.A. terminaux) à l'histone F_3 obtenue par chromatographie sur CMC, avec $\text{lys/arg} = 0,78$. Ces composants F_3 représentent environ 24% de l'histone totale. La fraction restant soluble dans l'éthanol possède par contre un rapport lys/arg de 1,1. Elle est nettement plus contaminée que le précipité F_3 , la dialyse contre l'éthanol ayant également tenu lieu de purification pour F_3 . Cependant, dans un travail ultérieur, Johns et Butler (1962), utilisent le même procédé d'extraction par éthanol-HCl 1,25 N (80:20) rapportent l'analyse du surnageant après dialyse contre l'éthanol et l'assimilent à une subfraction de F_2 (F_2 obtenue par CMC) désignée $F_2(a)$.

Ce procédé d'extraction par éthanol-HCl et dialyse contre éthanol absolu sera ensuite très couramment utilisé pour préparer les fractions $F_2(a)$ et F_3 de thymus: Johns (1964, 1967, 1968), Phillips et Johns (1965), Hnilica et coll. (1963, 1965).

Johns et Butler (1963) complètent ce premier procédé en le faisant suivre d'une extraction par éthanol 10% dans HCl 0,25 N, qui permet alors d'obtenir simultanément les fractions résiduelles F_1 et $F_2(b)$ séparables à leur tour par chromatographie (CMC) ou par précipitation sélective à l'acétone.

Phillips (1963) utilise au contraire un extrait direct par éthanol 10%-HCl 0,25N, qu'il chromatographie ensuite par CMC pour isoler F_1 , technique qu'il compare à l'extraction directe par HClO_4 5%.

Une dernière possibilité à signaler est l'emploi de l'éthanol absolu pour extraire $F_2(a) + F_3$ aussitôt après solubilisation directe de F_1 par HClO_4 5% (Johns, 1964). C'est donc ici en fait, le mélange éthanol- HClO_4 (HClO_4 provenant du résidu non lavé) qui conditionne l'extraction de $F_2(a) + F_3$ à l'image du mélange éthanol-HCl précédemment utilisé.

En conjuguant toutes ces propriétés d'extraction sélective des mélanges éthanol-HCl et de l'acide perchlorique avec des propriétés de précipitation sélective ou parfois la chromatographie, Johns et son équipe mettent au point plusieurs protocoles de fractionnement de l'histone de thymus en ses 4 principaux constituants: F_1 , $F_2(a)$, $F_2(b)$ et F_3 (voir plus loin).

De nombreux travaux ont par la suite appliqué ces schémas de fractionnement à d'autres tissus: c'est le cas de ceux de l'équipe

HNILICA (H NILICA ET coll, 1962, 1963, 1964, 1965, 1966) pour les histones de foie, rate et thymus de rat, d'érythrocytes de poulet et de diverses tumeurs. Citons également les travaux de MAZEN et CHAMPAGNE () et CHAMPAGNE et MAZEN () chez les érythrocytes de poulet, ceux de PIERRE et coll (1968) chez Tetrahymena pyriformis.

Il convient cependant de souligner que l'application directe de la méthode de Johns (1964) établie chez le thymus peut conduire à des déboires chez certains tissus, en particulier les tissus végétaux, dont les histones ont une constitution parfois différentes. S'il est indéniable que les protocoles de Johns présentent l'énorme avantage de fournir des fractions d'histones en quantités importantes ils ne permettent pas toujours, pour certains tissus, de donner un fractionnement aussi net qu'on le souhaiterait, entre les différents composants de l'histone.

Ainsi, même chez le thymus de veau lui-même, les fractions F₂(a) et F₂(b) préparées selon Johns ont été trouvées hétérogènes, par Murray (1965). De même, Mindley (1964) a démontré par électrophorèse acrylamide que ces fractions F₂(a) et F₂(b) étaient mutuellement contaminées à un degré élevé.

Il semblerait donc que les fractionnements préparatifs fondés entre autres sur l'extraction sélective ne conduisent pas toujours aux résultats que l'on souhaiterait, au moins pour certains tissus. Leur application devrait donc toujours être contrôlée parallèlement à l'aide d'un fractionnement analytique comme l'électrophorèse acrylamide afin de vérifier l'absence de contamination dans chacune des fractions.

Cependant, lorsque les fractionnements obtenus ne sont pas absolus, ce qui est fréquent lorsqu'on transpose une technique mise au point chez un autre tissu, certaines tendances relatives aux propriétés de solubilité des fractions peuvent être dégagées: en effet, les mêmes solvants ont des chances d'extraire, parmi des histones de constitution différentes, des fractions dont la composition en acides aminés sera du même type.

Ainsi, si la teneur en acides aminés aromatiques est à l'origine de la solubilité dans l'éthanol de F_{2a} de thymus, il est vraisemblable que les fractions obtenues chez l'histone de germe de Blé par les solvants de F_{2a} présenteront aussi une certaine richesse en

A.A. aromatiques, même si ces protéines sont électrophorétiquement distinctes.

Chez les végétaux, Spelsperg et Sarkissian (1968) utilisent ainsi simplement une extraction par éthanol-HCl, puis une extraction HCl 0,25N pour isoler respectivement ce qu'ils pensent être les fractions riches en arginine et riches en lysine. Ces auteurs extrapolent donc à leur tissu végétal (axe hypocotylé de haricot en germination) une propriété établie seulement chez le thymus et apparemment sans fournir d'analyses d'A.A., ils concluent à l'abaissement du taux arginine/lysine des histones au cours de la germination.

II Fractionnement en milieu neutre

Des données analytiques sur la dissociation de la DNP en solution saline concentrée, dues à CRAMPTON (1954) et l'étude électrophorétique de la dissociation, de FLEMING et JORDAN (1953), indiquent que cette dissociation est progressive et probablement incomplète.

Ceci fut confirmé par les travaux de DALY et MIRSKY (1955) et plus tard de GIANNONI et PEACOCKE (1963) qui montrent que les histones riches en lysine sont dissociées de l'ADN, plus tôt que les autres fractions.

HINDLET (1964) fait des constatations semblables à partir du comportement électrophorétique des histones extraites à différentes concentrations salines. Malheureusement, si la fraction F_I est dissociée de la première, lorsqu'on augmente la concentration en NaCl, les autres histones sont enlevées toutes ensemble (JOHNS, 1964), situation semblable à celle observée par abaissement du pH (MURRAY 1966).

L'explication de ce phénomène de dissociation progressive et en particulier de la séparation en premier lieu des fractions riches en lysine n'est pas évidente. PHILLIPS (1961) tentait d'élucider la question en soulignant les points suivants: a) les histones riches en lysine contiennent très peu d'arginine, Acide aminé qui donne probablement les liaisons salines les plus fortes avec l'ADN. b) elles contiennent très peu d'A.A. aromatiques ou hétérocycliques lesquels pouvaient être responsables de fortes liaisons de Vanderwaals avec d'autres structures en spirales. c) elles pouvaient être associées à un autre type d'ADN (Crampton et al. 1954; Lucy et Butler 1955, 1956) d) leur taille pouvaient être seulement le $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{3}$ de la taille des autres histones.

MURRAY (1965) propose plus tard un schéma précis de cette dissociation progressive de la DNP. A son avis, ce n'est pas le rapport lys/arg qui joue un rôle prépondérant dans cette opération; il pense au contraire qu'interviennent d'abord la taille moléculaire et la composition en A.A. et donc le nombre de résidus basiques pour une même quantité d'histone.

En effet, bien que les histones riches en lysine soient

les plus riches en résidus basiques, elles ont aussi des poids moléculaires plus élevés que les autres (sic.). Inversement, les histones riches en arginine ont des poids moléculaires plus faibles. En conséquence, et si l'on admet que tous les groupements basiques sont impliqués dans les liaisons avec les phosphates de l'ADN, on conçoit que, à quantités égales d'histones, pour libérer les fractions Ia et Ib, un plus petit nombre de liaisons doit être brisé (27 environ) que pour les IIb (38 environ) ou les III-IV (45 environ).

Lorsqu'on augmente la concentration en cations H^+ ou Na^+ , réduisant donc la probabilité pour les résidus NH_2 de rester en association étroite avec les phosphates de l'ADN, il faut s'attendre à ce que l'ordre dans lequel les histones sont dissociés dépende du nombre de liaisons électrostatiques devant être rompu, c'est-à-dire Ia et Ib d'abord, puis IIb enfin III-IV.

Cela expliquerait aussi l'analogie entre la dissociation progressive par le cation Na^+ et l'extraction par acides de concentration croissante (cation H^+).

Nous ignorons si cette conception est partagée ~~xxx~~ entièrement par d'autres auteurs, mais il est permis de se demander si les poids moléculaires trouvés récemment pour les composants de l'histone permettent de confirmer cette méthode et théorie.

En effet, en 1962, les poids moléculaires donnés par Johns et Butler (1962) étaient respectivement pour F_I , F_2 et F_3 , de 52 000, 28 500 et 18 000, valeurs en accord avec la théorie de MURRAY. Dans la revue de Butler et coll. (1968), les valeurs des poids moléculaires sont, par contre, peu reproductibles selon la méthode de détermination employée et d'autre part relativement du même ordre pour les divers composants de l'histone de thymus: F_I : 16 000, $F_2(a)_I$: 15 000, $F_2(a)_2$: 20 000, $F_2(b)$ 11 000 à 15 000, F_3 : 16 000 à 18 000. Nous ne pensons pas que ces valeurs puissent expliquer, selon la théorie de Murray, une telle différence d'extractibilité entre F_I et les autres groupes.

Un travail très récent de HENSON (1970) rapporte la dissociation de la nucléohistone en milieu salin NaCl de 0 à 2M. à l'aide de la gel-filtration sur sépharose 4B. L'auteur constate encore qu'entre NaCl 0,5 M et 0,7 M, la fraction F_I prédomine parmi les protéines se dissociant de l'ADN. Entre 0,7 M et 1 M, F_I est accompagnée de F_2a_2 , F_2b et F_3 . Entre 1 M et 2 M on trouve encore $F_2a_2 + F_2b + F_3$.

Changere et Maren (1955) sur l'histone d'érythrocytes de poulet,
utilisent un virus de 6 jours au froid dans NaCl natif, de la DNP.
Celle-ci précipite partiellement : l'histone catayte de la DNP précipitée,
correspond à des fractions $F_{2a} + F_3$ de Johns. La DNP suragante
est alors déprotéinée par $CHCl_3$ - alcool isoamylique, ce qui donne
une fraction voisine de $F_{2b} +$ traces de F_1 .

Si ce protocole est appliqué au thymus on trouve la fraction F_1
de Johns dans la DNP précipitée !

L'auteur ne mentionne cependant pas la présence de "protéine résiduelle"
qu'une déprotéinisation devrait séparer, partiellement au moins, de l'ADN.

tandis que F_{2a_I} ne se dissocie que vers NaCl 2M. Pour cette dernière molarité, l'histone est enlevée totalement de l'ADN.

Comme le signalaient HINDLEY (1964) et JOHNS (1964), la dissociation en milieu NaCl ne permet donc pas l'extraction spécifique d'autres fractions que F_I . C'est pourquoi, en vue d'améliorer ce procédé, certains auteurs ont pensé à ajouter de l'éthanol à différentes concentrations, aux solutions NaCl. Il a été trouvé ainsi que l'éthanol 75% à 2% de NaCl (0,34 M) extrait cette fois sélectivement la fraction $F_2(a)$ et non la F_I , comme par NaCl seul.

Ce procédé a encore été amélioré en substituant au NaCl le chlorhydrate de guanidine 10%. La méthode semble actuellement au point pour extraire sélectivement la fraction $F_2(a)$, à pH 7, à partir de la DNP, sans isolement préliminaire de la fraction F_I et avec de plus une possibilité de subfractionnement de $F_2(a)$ en $F_2(a)_I$ et $F_2(a)_2$ par précipitation sélective à l'acétone ou l'acétone-HCl (Johns 1967).

L'emploi de chlorhydrate de guanidine 10% à la place de NaCl 2% est dû uniquement à sa solubilité dans l'acétone (pour éviter les problèmes liés à l'élimination de sels inorganiques) et qui rend plus aisée la préparation des fractions histones. Par contre, si l'on s'intéresse à la DNP résiduelle plutôt qu'aux histones extraites, on emploiera de préférence le NaCl.

L'explication de l'extraction sélective de $F_2(a)$ par des concentrations élevées en éthanol, tant à pH neutre que précédemment en milieu acide, est à rechercher dans son caractère hydrophobe. Sa solubilité dans l'éthanol absolu qui permet de la séparer de F_3 , après dialyse du mélange $F_{2a} + F_3$ pourrait expliquer qu'elle ait été perdue lors de la préparation de l'histone par certains procédés qui utilisent une précipitation par l'éthanol.

En conclusion de ce chapitre sur l'extraction sélective à pH neutre, il apparaît que les procédés utilisés ont été beaucoup moins nombreux que ceux à pH acide, mais que leur avantage principal est de fournir des protéines non dénaturées (tandis que l'action d'un acide fort entraîne sinon une hydrolyse, du moins une transformation de la structure hélicoïdale en structure β), ainsi que de permettre des études physiques de la DNP résiduelle.

FRACTIONNEMENT DES HISTONES

2° partie:

FRACTIONNEMENT PAR PRECIPITATION SELECTIVE

Ce deuxième type de fractionnement correspond à la séparation des composants d'une histone totale déjà isolée à partir de la DNP, ou de plusieurs fractions de cette histone obtenues par un autre procédé (extraction sélective, chromatographie). Il n'est donc plus question ici de DNP ni de propriétés d'attraction entre les différentes histones et l'ADN. Il s'agit seulement de séparer les composants d'un mélange. Les moyens utilisés ne peuvent faire intervenir que les propriétés de solubilité des diverses fractions dans différents milieux (bases, acides, solutions salines, solvants organiques).

I - Fractionnement utilisant les différences de solubilité dans l'alcool ou l'acétone:

1) Séparation de fractions histones à partir d'une solution acide d'histone totale de thymus de veau:

Les fractions les plus riches en arginine (F3 ou F2) sont toujours les moins solubles. CRUFT et al. (1957) emploient de l'alcool à 33 % à pH 6,3 pour la précipitation spécifique de ces 2 fractions. BIJVOET (1957) sépare un composant I par précipitation dans l'éthanol 20 %, qui représente 80 % de l'histone totale et qui correspond à des fractions riches en arginine (ce composant contient aussi probablement le groupe moyennement riche en lysine F2). Le composant II, très riche en lysine est alors simplement obtenu par lyophilisation.

UI (1956, 1957) précipite aussi les histones autres que le type riche en lysine, dans H_2SO_4 0,1 N, par addition de 20 % d'éthanol et repos à - 5° C, puis les histones riches en lysine par 45 % d'éthanol à - 10° C.

Le groupe riche en lysine peut aussi être obtenu, après précipitation des autres, soit par addition de 2 ou 3 volumes d'éthanol ou d'acétone, après ajustement à pH 6, ou mieux, à pH 11 (DALY et MIRSKY, 1955; DAVISON, 1957; HOLBROOK, 1960), soit par l'acide perchlorique (BUSCH, 1959), soit par dialyse contre 100 % d'éthanol (CRUFT, 1957).

2) Fractionnement du mélange F2a - F3:

A partir d'un extrait éthanol-HCl 1,25 N (80 : 20) qui solubilise sélectivement les fractions F2a et F3 d'une DNP, (JOHNS, (1960) et JOHNS et BUTLER (1962) utilisent une dialyse contre l'éthanol 100 % dans lequel F3 précipite et F2a reste soluble. Cette dernière fraction peut être alors récupérée par addition de 3 volumes d'acétone qui la précipitent.

3) Fractionnement du mélange F1 - F2b:

Le mélange extrait par éthanol 10 % - HCl 0,25 N (JOHNS et BUTLER, 1962) ou par HCl 0,25 N (JOHNS, 1964) après extraction de F2a et F3 peut être fractionné en ses composants par addition d'acétone (JOHNS, 1964): 3 volumes d'acétone précipitent F 1 et 2 volumes supplémentaires précipitent F2b. Notons que par dialyse contre l'éthanol 100 %, F 1 et F2b précipitent simultanément.

4) Subfractionnement d'un composé de l'histone de thymus:

a) Fraction F 1 (par précipitation sélective à l'acétone):

JOHNS (1964) précipite une subfraction A, très riche en lysine, représentant 4/5 de F 1, en ajoutant 3,3 volumes d'acétone à une solution de F 1 dans HCl 0,01 N à 5 % de chlorhydrate de guanidine. La subfraction B est alors recueillie par addition d'un volume supplémentaire d'acétone. B est un peu moins riche en lysine. A correspond au pic A de CRAMPTON et al. (1957) ainsi qu'au pic 3 de chromatogramme sur CMC réalisée par JOHNS (1964).

b) Fraction F2a:

PHILLIPS et JOHNS (1965) suggèrent de recommencer pour F2a seule la dialyse contre l'éthanol qui a permis de séparer cette fraction de F3. Cette fois, lorsque la concentration en éthanol atteint 98 % et la concentration en acide, 0,06 N HCl, on réalise un fractionnement: F2a2 a précipité tandis que F2a1 reste soluble. Les mêmes auteurs recommandent cependant une autre méthode: l'addition de 3,2 % d'HCl concentré suivie de 2,75 volumes d'acétone à une solution d'histone F2a dans HCl 0,01 N amène la précipitation de F2a1, 0,9 volume d'acétone supplémentaire provoquant la précipitation de F2a2.

Les auteurs soulignent l'importance de l'ordre dans lequel les solvants doivent être ajoutés: acide d'abord, acétone ensuite. Si l'acétone est ajoutée en premier lieu, rien ne précipite, même avec 4 volumes, encore que dans ces conditions c'est F2a2 qui tend à précipiter la première et non F2a1 !

Cette inversion de la précipitation est aussi constatée lorsqu'on dialyse contre l'éthanol puisque F2a2 précipite alors la première tandis que F2a1 reste soluble. Il en est de même lorsqu'on dialyse F2a contre le n - propanol ou le n - propanol + éthanol (HNILICA, 1965).

En 1967, JOHNS propose 2 nouveaux procédés de fractionnement de F2a en ses 2 composants. Mais il s'agit ici d'une F2a extraite de la DNP à pH 7 par éthanol-GuCl. Un premier fractionnement est possible tout en demeurant à pH 7 à l'aide d'un volume d'acétone qui précipite F2a2, puis de 2 volumes supplémentaires qui précipitent F2a1. Un deuxième fractionnement fait intervenir HCl 1,8 % suivi de 1,75 volume d'acétone (précip. de F2a2) puis de 1,1 volume supplémentaire (précip. de F2a1).

5) Conclusions:

Comme on a pu le constater, les facteurs qui régissent les caractères de solubilité ou de précipitation, surtout pour la fraction F2a, ne sont pas simples. Le fait qu'une fraction soit présente seule ou accompagnée d'autres fractions dans la solution joue nettement. Ainsi, 20 % en éthanol précipitent F3 + F2 (donc F2a), tandis qu'une dialyse contre l'éthanol 100 % du mélange F3 + F2a laisse F2a en solution ! Cette même dialyse de F2a seule ne précipite que le composant F2a2, F2a1 restant soluble !

D'autre part, la présence d'un acide fort avant précipitation semble fondamentale, probablement par la transformation de l'histone en un sulfate ou un chlorhydrate aux propriétés de solubilité sensiblement différentes. Ainsi l'adjonction d'acétone après acidification précipite F2a1 d'abord (PHILLIPS et JOHNS, 1967), alors que sans HCl, c'est F2a2 qui tend à précipiter en premier lieu. L'acidification préalable favoriserait donc la précipitation de F2a1, alors qu'en milieu moins acide, F2a2 serait la moins soluble.

Selon nous, un autre facteur doit encore être considéré: JOHNS (1967) précipite en effet F2a2 avant F2a1 à l'aide d'acétone à pH 7 ou même avec acétone-HCl, c'est-à-dire dans des conditions très voisines de celles de PHILLIPS et JOHNS (1965) où l'ordre de précipitation est inverse ! La seule différence est que dans le premier cas (JOHNS, 1967) la fraction F2a est obtenue à pH 7 et non en milieu acide. Les conditions d'extraction de l'histone à partir de la DNP influenceraient donc les caractéristiques de solubilité des fractions.

Vu la complexité et la finesse des mécanismes intervenant dans ce fractionnement par précipitation aux solvants organiques, on conçoit donc que les fractionnements réalisés par différents auteurs avec une même histone ne soient pas toujours également satisfaisants et que, a fortiori, la transposition des résultats observés chez le thymus à d'autres histones ne permette pas d'aboutir à un fractionnement idéal.

Précisons enfin que le secteur végétal n'offre que de très rares exemples de tels fractionnements:

JOHNS et BUTLER (1962) obtiennent 2 fractions à partir d'une solution d'histone de germe de blé en y ajoutant successivement 5 vol. d'acétone + 0,33 % d'HCl 1N, ce qui précipite la fraction A, puis 5,5 vol. supplémentaires (fraction B). A et B diffèrent au point de vue composition en acides aminés: A est assez riche en lysine, mais beaucoup moins que F₁ du thymus, tandis que B est voisine de F₂ du thymus malgré que 79 % de ses acides aminés terminaux soient représentés par l'alanine (ce qui est d'ailleurs curieusement caractéristique de histones F₃, absentes chez le germe de blé).

GOFSHTEIN (1968) reprend ce même type de fractionnement de l'histone de germe de blé (en utilisant HCl concentré au lieu de 1 N) et constate qu'aucune de ces 2 fractions n'est modifiée significativement par la germination de l'embryon. L'auteur oriente également son travail vers l'autoradiographie des diagrammes électrophorétiques de ces 2 fractions, après incorporation de C 14 pour identifier les fractions métaboliquement intéressantes.

II - Fractionnement fondé sur l'insolubilité en milieu alcalin:

Par définition, les histones sont des protéines basiques, dont le pH isoélectrique se situe entre 9 et 11. C'est donc en ce point que se situe le minimum de solubilité.

Selon VENDRELY et VENDRELY (1966), les histones sont précipitées, au moins partiellement, à ces pH. En fait, seules les fractions les plus basiques (arginine-rich et slightly lysine-rich) tendent à précipiter à pH 11. Pour isoler ces deux fractions, il suffit donc d'amener le pH à cette valeur par NH₄OH. La fraction résiduelle (lysine-rich) est alors obtenue par addition d'alcool ou d'acétone. Ces résultats ont d'ailleurs

été observés depuis longtemps (DAVISON et BUTLER, 1954; DAVISON et SHOOTER, 1956; BUSCH et al., 1959; HOLBROOK et al., 1960).

Selon DAVISON et SHOOTER (1956) et PHILLIPS et JOHNS (1959), en présence de NaCl 1 M, l'ammoniaque à concentration finale de 0,06 M ne précipite que la moitié de l'histone: (la fraction riche en arginine et une partie de la fraction faiblement riche en arginine), le surnageant contenant le reste de cette dernière (dont le N terminal est la proline) et la fraction riche en lysine.

Selon CRUFT et al. 1958, la précipitation isolélectrique semble due à la formation d'agrégats vers pH 9,3, chez les histones riches en arginine. L'auteur sépare ainsi ces histones à pH 9,3 et à force ionique 3,5 à 4 tandis que les histones faiblement riches en lysine (désignées 1,6 S_v) sont précipitées du surnageant après ajustement à pH 10, à force ionique 0,2 et dans l'éthanol 17 %.

Rappelant également les résultats de DAVISON (1957), DAVISON et SHOOTER (1956), DOUNCE et UMANA (1962), UMANA et al. (1964), LINDH et BRANTMARK (1966) concluent que l'ajustement à pH 10,5 ou 11 d'une solution d'histone provoque une séparation en 2 groupes: le précipité isoélectrique qu'on peut assimiler aux histones les plus riches en arginine (car CRUFT et al. 1950 et BIJVOET 1957 ont montré que ce sont les histones riches en arginine qui forment facilement des agrégats aux pH neutres et alcalins), tandis que le surnageant, récupérable par addition de 3 volumes d'éthanol contient les histones relativement plus riches en lysine.

Chez les tissus végétaux, la seule allusion à un fractionnement en milieu alcalin est faite par Johns et Butler (1962): les auteurs constatent que l'addition d'un égal volume d'ammoniaque ($d = 0,880$) à une solution d'histone de germe de blé, un très léger trouble apparaît, mais pas de précipité véritable. Le fait que les histones riches et moyennement riches en arginine sont habituellement précipitées dans ces conditions permet de conclure à l'absence de fractions similaires dans l'histone de germe de blé.

N.B.: Klyszejko, 1964 signale un fractionnement "par précipitation à pH 10,6 et pH 6,0", selon Daly et Mirsky, mais aucune précision n'est donnée sur la méthode. Selon l'auteur, la fraction pH 6,0 est riche en lysine. Celle à pH 10,6 est plus riche en arginine.

III - Fractionnement utilisant différentes concentrations salines:

Dès 1957, UI signale qu'un fractionnement satisfaisant peut être obtenu par relayage: une fraction I (histones riches en arginine et faiblement riches en lysine) précipite à 60 % de saturation dans NaCl. Une fraction II (histones riches en lysine) reste soluble même dans NaCl saturé mais précipite dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturé.

PHILLIPS (1961) précise que la saturation par NaCl d'une solution d'histone précipite environ 50 % de l'azote total, les mêmes histones pouvant être obtenues aussi bien par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,25 M. La majorité de ces histones forme le pic électrophorétique rapide visible à pH 4,5 (Davison et Shooter 1956; Smilbie et al., 1958). Les histones restant solubles dans NaCl saturé sont celles qui peuvent être précipitées par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,25 M. Elles forment la région électrophorétique la plus lente (Smilbie et al., 1958) et équivalent peut être aux gamma-histones de CRUFT (1957).

Champagne et Mazen (1965) constatent que la précipitation par NaCl saturé de l'histone totale (d'érythrocytes de poulet) fait perdre certaines fractions, probablement riches en lysine.

Enfin Hnilica et Bess utilisent NaCl 1 M pour fractionner le groupe F_2a de thymus: la subfraction F_2a_1 précipite, alors que F_2a_2 y reste soluble.

IV - Fractionnement utilisant l'acide trichloracétique:

L'ATC, comme agent précipitant des protéines, est supposé produire une précipitation fractionnée selon la concentration utilisée.

Selon Daly et Mirsky (1955), l'ATC à concentration finale de 5 % précipite 84 % de l'histone, les fractions riches en lysine restant seules en solution.

Luck et al. (1958), SATAKE et al. (1960) précipitent les fractions arginine-rich et slightly lysine-rich par ATC 0,45 N ou 0,60 N (soit 7,5 à 10 %) et même à concentration inférieure. Les fractions riches en lysine ne sont précipitées que vers 0,8 à 1 N (10 à 13 % ATC). Les différences ont d'ailleurs permis l'estimation néphélométrique des pics de chromatographie et de déceler la présence de plusieurs fractions d'histone dans un pic multiple (Satake et al. 1960).

L'ATC a été également utilisé pour achever un fractionnement, généralement pour précipiter les fractions riches en lysine, après élimination (par tout autre moyen) des fractions riches en arginine. C'est le cas de Kent et al. (1958) qui semblent précipiter ces fractions par le sulfate de dextrane ou l'héparine à partir d'une solution 0,14 M. C'est aussi le cas de Johns (1964) et Mazen et Champagne (1965) qui précipitent f_1 par ATC 18 % et de Johns et Butler (1962) qui récupèrent f_1 ou f_2^b par ATC 12 %. Précisons que l'histone ainsi précipitée est généralement lavée par l'acétone-HCl (pour éliminer l'ATC) puis l'acétone et enfin séchée à l'air ou sous vide.

L'ATC a aussi la propriété de favoriser l'agrégation de F_{2a_1} . C'est ainsi que Johns (1968) sépare les composants de F_2a par électrophorèse amidon, en incorporant de l'ATC au gel: F_{2a_2} migre tandis que les agrégats formés par F_{2a_1} ne migrent pas. L'auteur signale que ce mécanisme d'agrégation n'est pas connu. Il ne peut être relié qu'à la composition spéciale de F_{2a_1} ($> 15 %$ de glycine et très peu de proline).

V - Conclusions sur le fractionnement par précipitation sélective:

C'est l'emploi de solvants organiques polaires (alcool, acétone) qui semble permettre les fractionnements les plus sensibles. Les autres principes utilisés (milieu alcalin, sels, ATC) ne l'ont été que dans de très rares cas, surtout vers 1954 à 1960, et sont rarement employés de nos jours. Ils ne permettent en effet, qu'une séparation très grossière: généralement en histones riches en lysine les plus solubles et les autres (riches et moyennement riches en arginine), les moins solubles. On note l'équivalence des 3 principaux procédés:

- ajustement à pH 10,6 ou 11
- saturation par NaCl
- adjonction d'ATC à concentration finale de 7 à 10 %

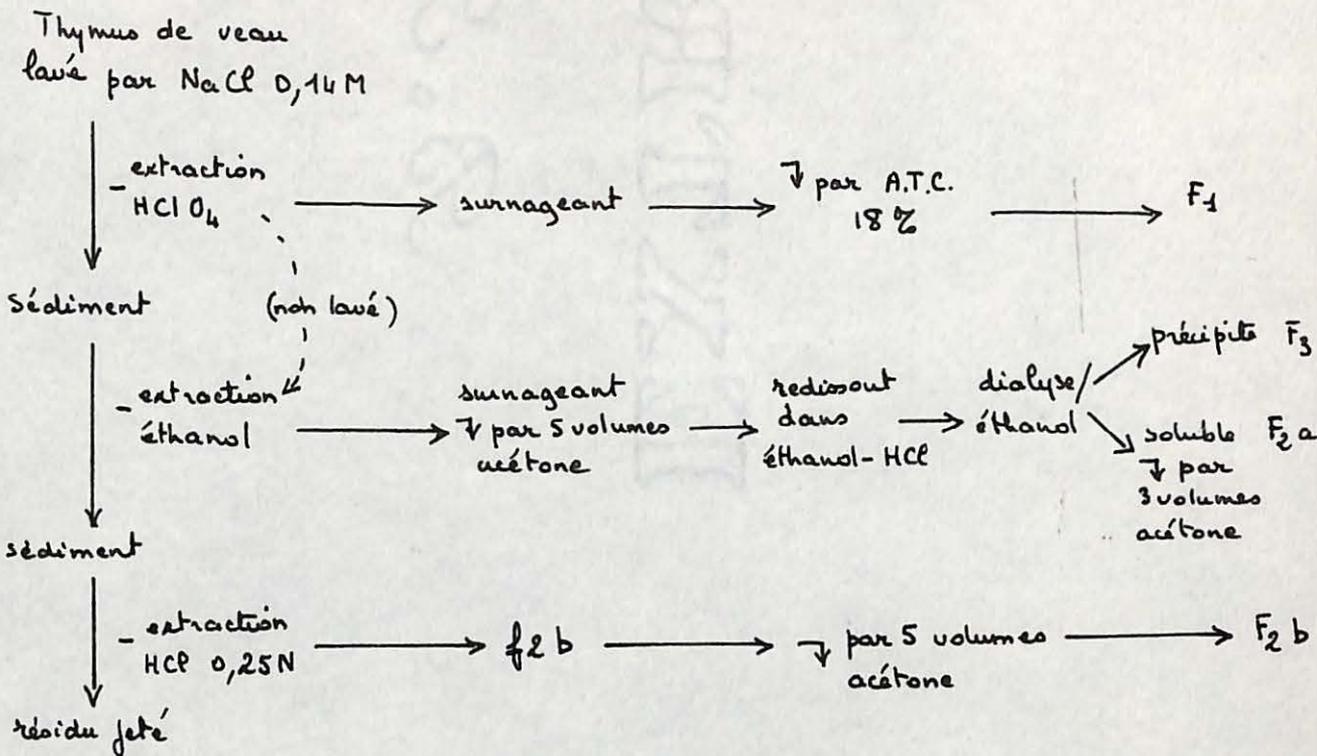
pour précipiter les fractions les plus riches en arginine.

Les fractions riches en lysine ne sont précipitées qu'en accentuant les actions précédentes (adjonction d'éthanol à la solution basique, adjonction de $(NH_4)_2SO_4$ à la solution de NaCl, augmentation de la concentration en ATC jusqu'à 10-13 % ou même 18 %).

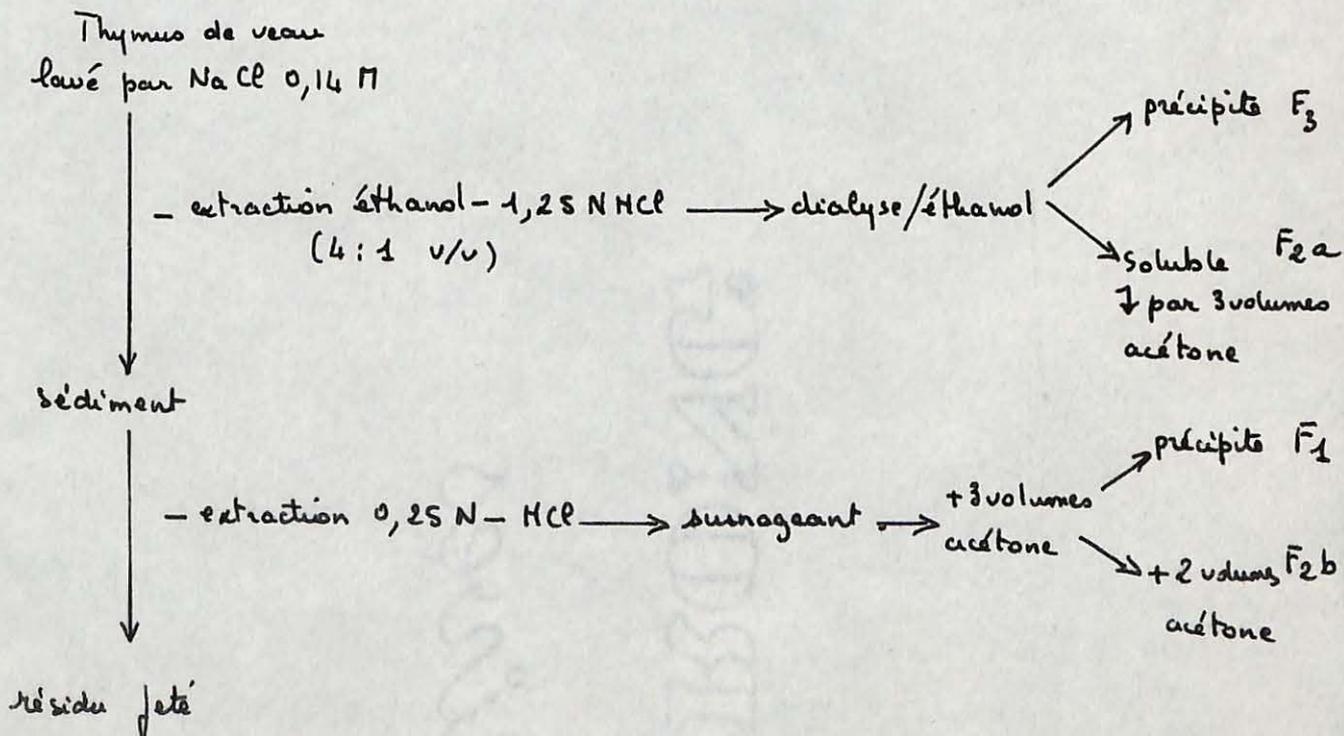
La plupart de ces travaux ayant eu lieu avant 1960, époque où ne se pratiquait encore que l'électrophorèse en veine liquide (pour les histones, du moins), on manque de renseignements précis sur la valeur exacte des bandes qui sont ou ne sont pas précipitées dans les conditions

1964

9



1964



Ces protocoles ont l'énorme avantage d'être préparatifs: 100 g seulement de thymus donnent environ 2.400 mg d'histone totale ou encore:

environ	440 mg de f_1	(18 %)
	880 mg de f_{2a}	(24,7 %)
	605 mg de f_{2b}	(36 %)
	520 mg de f_3	(21,3 %), ce qui est considérable.

Mais ce protocole n'est au point que pour l'histone de thymus et dans des conditions bien précises, de sorte qu'un autre expérimentateur ne saurait parvenir d'emblée au même fractionnement.

Lorsqu'on travaille sur une autre histone, de constitution différente, on ne peut plus obtenir les mêmes groupes d'histones. Une étude complète est alors à recommencer.

Bien que la quasi totalité des résultats se rapportent à l'histone de thymus, il semble que chez le germe de blé, on trouve une histone notablement différente, en particulier du fait de l'absence du groupe F_3 très riche en arginine. On manque cependant de données précises pour le secteur végétal tout entier.
