

BIOCHIMIE. — *Originalité de constitution des histones du germe de blé*. Note (\*) de MM. Jean-Claude Autran et Albert Bourdet (<sup>1</sup>), présentée par M. Jean Roche.

Les principaux composants électrophorétiques de l'histone du germe de blé ont été isolés par fractionnement préparatif combinant la précipitation par l'acétone et la chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose. Sur la base de diverses caractéristiques physico-chimiques, notamment la composition en acides aminés, les fractions isolées ont été apparentées à des types classiques de fractions histones. Cependant, la faible différenciation du groupe F<sub>1</sub> et l'absence quasi totale du type F<sub>3</sub> semblent conférer à l'histone de germe de blé une constitution inhabituelle.

La majeure partie des travaux relatifs aux histones a concerné, jusqu'ici, les tissus animaux et plus particulièrement le thymus de veau. La connaissance des histones végétales, qui ne s'est en partie développée que par analogie avec celle acquise dans le domaine animal, accuse un net retard sur ce dernier. En effet, au niveau des quelques végétaux analysés, seule l'histone de pois a fait l'objet d'études détaillées [(<sup>2</sup>), (<sup>3</sup>)]. Celle du germe de blé, qui fut pourtant la première histone végétale identifiée (<sup>4</sup>) et dont certaines particularités ont été signalées [(<sup>5</sup>), (<sup>6</sup>), (<sup>7</sup>)], reste encore mal connue sur le plan physico-chimique. L'objet de la présente Note est donc de mieux préciser, de ce point de vue, les caractères particuliers de l'histone de germe de blé. Pour cela, il est fait appel à un isolement préparatif et à une analyse des principaux composants électrophorétiques de cette protéine.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — L'histone est obtenue à partir de germes de blé industriels, par l'intermédiaire de la désoxyribonucléoprotéine, selon un procédé précédemment décrit [(<sup>8</sup>), (<sup>9</sup>)].

Les fractionnements analytiques sont réalisés en plaques de gel de polyacrylamide, en milieu acide acétique, urée 6,25 M, pH 3,2 [(<sup>9</sup>), (<sup>10</sup>)].

L'isolement des composants de l'histone est obtenu en conjuguant les possibilités offertes par deux méthodes simples : d'une part, la précipitation sélective par addition progressive d'acétone à une solution acide d'histone, d'autre part, la chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose en milieu formiate avec élution par un gradient linéaire de NaCl (<sup>11</sup>).

Les déterminations d'acides aminés ont été faites avec un analyseur automatique « Technicon » par la méthode de Moore et Stein. Les valeurs correspondent à un temps d'hydrolyse de 24 h. Les acides aminés soufrés ont été dosés après oxydation performique.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS. — En comparant les diagrammes électrophorétiques des histones de thymus de veau et de germe de blé (*fig. 1*), on met en évidence une nette différence de constitution. L'histone de thymus, maintes fois décrite, se compose de 5 fractions dont l'identification est possible à partir des travaux de Fambrough et Bonner (<sup>2</sup>) ou de Panyim et Chalkley (<sup>10</sup>). Par ordre de mobilité croissante, on reconnaît ainsi les composants F<sub>3</sub> dimère, F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub> + F<sub>2</sub> b, F<sub>2</sub> a<sub>2</sub> et F<sub>2</sub> a<sub>1</sub>. En revanche,

faute de références antérieures, on ne peut identifier les 7 fractions (numérotées de 1 à 7) de l'histone de germe. D'où la nécessité d'isoler séparément les principales d'entre elles en vue de les analyser et de les apparenter éventuellement à des types histones connus, comme l'a fait récemment l'équipe de Bonner [(2), (3)] dans le cas du pois.

Ainsi, on observe (*fig. 2*) que l'addition d'acétone à une solution acide d'histone de germe entraîne une précipitation progressive des différents composants : si les fractions les plus lentes (n<sup>os</sup> 1, 2 et 3) sont insolubilisées dès 3 volumes de solvant, il faut jusqu'à 8 volumes pour obtenir la fraction la plus rapide (n<sup>o</sup> 7).

Par ailleurs, contrairement à la chromatographie classique de Johns et coll. (12) qui n'aboutit, dans le cas particulier de l'histone de germe, à aucune séparation [(6), (11)], nos conditions expérimentales permettent un fractionnement significatif en 3 pics de constitutions électrophorétiques très différentes (*fig. 3*).

Si, enfin, on conjugue les deux procédés ci-dessus, il devient possible d'isoler les 4 principales fractions de l'histone de germe, c'est-à-dire :

- un composant regroupant les bandes n<sup>os</sup> 1-2-3 (pic 1 de chromatographie de l'histone totale) ;
- un composant n<sup>os</sup> 4-5 (précipité par l'acétone entre 3 et 3,5 volumes) ;
- un composant n<sup>o</sup> 6 (pic 3 de chromatographie de la fraction précitée par l'acétone entre 3,5 et 4,5 volumes) ;
- un composant n<sup>o</sup> 7 (précipité par l'acétone entre 5 et 8 volumes).

Le résultat de ces isolements est illustré sur la figure 4 au moyen du diagramme électrophorétique des 4 fractions obtenues, comparativement à une histone totale témoin et à celui d'une histone reconstituée en remélangeant ces 4 fractions. Pour une meilleure compréhension, nous avons jugé utile d'anticiper sur certaines conclusions de cette Note en désignant dès à présent les fractions isolées par les symboles F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> b, F<sub>2</sub> a<sub>2</sub> et F<sub>2</sub> a<sub>1</sub>, selon la nomenclature de Johns et coll. (12). Il en est de même dans le tableau qui met en évidence les différences particulièrement significatives de composition en acides aminés des 4 fractions isolées.

A partir des résultats ainsi obtenus, notamment quant au caractère apolaire (degré de solubilité dans l'acétone), à la charge électrique (chromatographie), au rapport  $e/m$  de la charge à l'encombrement moléculaire (électrophorèse) et à la composition en acides aminés, il devient possible d'identifier les fractions de l'histone de germe.

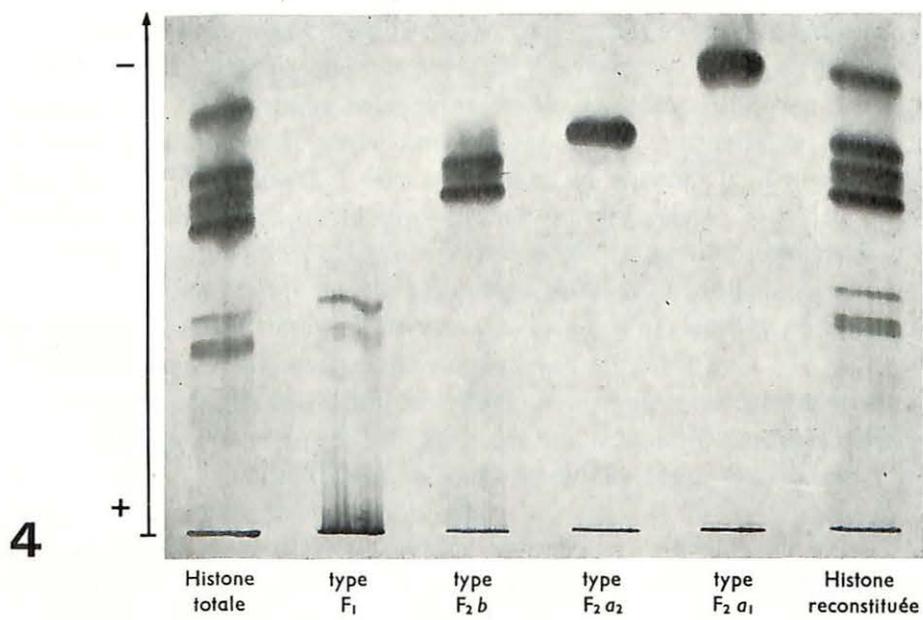
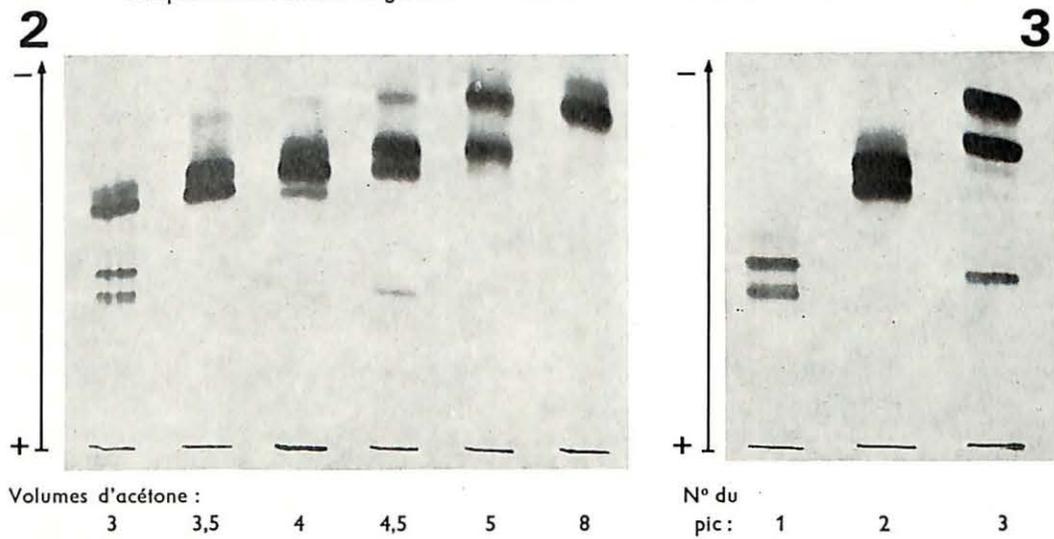
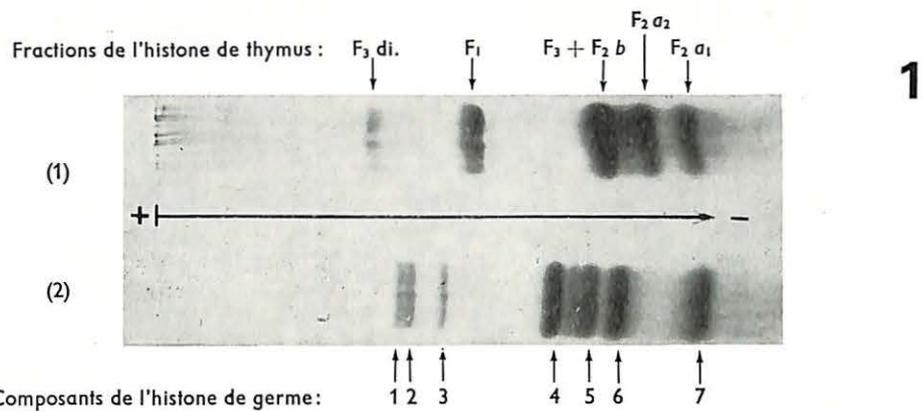
#### EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Comparaison des diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide d'une histone de thymus de veau (1) et d'une histone de germe de blé (2).

Fig. 2. — Constitution électrophorétique des précipités successifs obtenus par addition d'acétone à une solution acide d'histone de germe.

Fig. 3. — Constitution électrophorétique des 3 pics obtenus par chromatographie sur CMC d'une histone de germe.

Fig. 4. — Diagramme électrophorétique des 4 principaux composants de l'histone de germe de blé.



TABLEAU

Composition en acides aminés (en moles d'acide aminé pour 100 moles des acides aminés présents)  
de 4 fractions de l'histone de germe de blé

	Histone totale de germe de blé	Bande 7	Bande 6	Bandes 4-5	Bandes 1-2-3
		type « F <sub>2</sub> a <sub>1</sub> » ou GAR-histone (* )	type « F <sub>2</sub> a <sub>2</sub> » ou ALR-histone (* )	type « F <sub>2</sub> b » ou SLR-histone (* )	type « F <sub>1</sub> » ou VLAR-histone (* )
Acide aspartique <sup>7</sup> A	4,5	5,6	4,2	5,5	3,8
Thréonine .....	5,6	6,4	6,0	5,5	6,3
Sérine .....	4,4	2,7	4,2	6,2	5,4
Acide glutamique A	7,6	7,4	9,0	8,0	5,5
Proline .....	7,5	2,0	5,8	6,8	9,7
Glycocolle .....	8,0	13,8	8,6	7,7	6,8
Alanine .....	13,0	8,2	12,5	14,1	19,8
Valine .....	5,9	8,9	6,0	6,7	5,4
Cystéine .....	0	0	tr.	0	0
Méthionine .....	tr.	0,4	0,4	0,5	0
Isoleucine .....	5,1	6,4	5,5	5,4	3,4
Leucine .....	8,1	8,4	9,1	6,6	5,8
Tyrosine .....	2,1	3,9	2,1	2,1	1,4
Phénylalanine ....	2,4	2,7	3,4	2,5	2,2
Lysine B .....	15,3	8,2	9,4	14,8	16,3
Histidine B .....	1,8	2,1	2,1	1,9	1,9
Arginine B .....	8,2	12,8	11,6	5,6	5,7
Lys/Arg .....	1,86	0,64	0,81	2,64	2,86
Acides A .....	12,1	13,0	13,2	13,5	9,3
Basiques B .....	25,3	23,1	23,1	22,3	23,9
B/A .....	2,09	1,78	1,75	1,65	2,57

(\* ) GAR, glycine-arginine rich ; ALR, arginine-lysine rich ; SLR, serine-lysine rich ; VLAR, very lysine-alanine rich.

Ainsi, le composant désigné 1-2-3, qui apparaît le moins chargé, le plus polaire, le plus riche en lysine et alanine présente les caractères typiques du type F<sub>1</sub> (VLAR histone). De même, pour le composant 4-5, sa composition en acides aminés, sa richesse en lysine et en sérine, son dédoublement, suggèrent une analogie avec le type F<sub>2</sub> b (SLR histone), tandis que, selon un raisonnement analogue, la bande 6 se classe dans la catégorie riche en arginine et en lysine F<sub>2</sub> a<sub>2</sub> (ALR histone). Enfin, la bande 7 frontale, la plus hydrophobe, présente une mobilité et une composition en acides aminés pratiquement identiques à celles de l'histone F<sub>2</sub> a<sub>1</sub> riche en glycocolle et arginine (GAR histone) du thymus de veau, ce qui viendrait confirmer l'hypothèse d'une structure quasi universelle pour cette fraction (3).

L'histone de germe de blé présente donc certaines analogies avec ses homologues végétales et animales : prédominance des acides aminés basiques, présence de plusieurs fractions s'apparentant à des types classiquement décrits, hétérogénéité limitée à 7 bandes électrophorétiques.

Mais, par ailleurs, nos résultats mettent en évidence une nette originalité de constitution. Ainsi, aucun composant majeur ne semble s'apparenter au type F<sub>3</sub>

habituellement présent dans les histones, anomalie qui confirme certaines observations antérieures [(<sup>5</sup>), (<sup>6</sup>)] et explique plusieurs particularités des caractères de solubilité de l'histone de germe de blé (<sup>11</sup>). Selon nous, ce type F<sub>3</sub> pourrait seulement figurer à l'état de traces et, comme chez le pois, à l'état de monomère ou de dimère. La forme monomère qui présenterait la même mobilité que la bande n° 6, serait donc habituellement masquée, mais expliquerait la présence de cystéine dans ce composant F<sub>2</sub> a<sub>2</sub>. En revanche, la forme dimère serait visible et correspondrait à la faible bande de mobilité intermédiaire qui accompagne parfois le composant n° 6 (*fig. 2 et 3*). On note, d'autre part, que le type F<sub>1</sub> ne possède pas ici toutes ses caractéristiques habituelles : son rapport lysine/arginine n'est ainsi que de 2,86 au lieu de 10-15 chez le pois ou le thymus. On trouve donc en fait un large groupe englobant des types F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> b aux propriétés assez voisines.

*En conséquence*, si l'histone de germe renferme bien les catégories habituelles de fractions histones, les types extrêmes F<sub>1</sub> et F<sub>3</sub> apparaissent ici très atténués, ce qui rend la protéine plus faiblement différenciée au plan physico-chimique, en dépit d'une hétérogénéité électrophorétique normale.

Comment expliquer cette originalité ? Il n'est pas certain qu'il faille l'attribuer au caractère embryonnaire du germe de blé car, d'une part, les histones d'embryons d'autres végétaux comme le pois, le seigle ou le riz sont de type classique et, d'autre part, celles isolées d'autres tissus du grain de blé [(<sup>9</sup>), (<sup>11</sup>)] ne diffèrent pas fondamentalement de celles du germe. Aussi, dans l'attente de nouveaux résultats relatifs, par exemple, aux histones de différents organes de la plante de blé, il nous semble permis de maintenir l'hypothèse d'un *caractère physico-chimique spécifique* des histones du germe de blé.

(\*) Séance du 1<sup>er</sup> octobre 1973.

(1) Avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> Ginette Gobin.

(2) D. M. FAMBROUGH et J. BONNER, *Biochim. Biophys. Acta*, 175, 1969, p. 113-122.

(3) R. J. DE LANGE, D. M. FAMBROUGH, E. L. SMITH et J. BONNER, *J. Biol. Chem.*, 244, 20, 1969, p. 5669-5679.

(4) E. STEDMAN et E. STEDMAN, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 235, Série B, 1951, p. 565-596.

(5) H. J. CRUFT, C. M. MAURITZEN et E. STEDMAN, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, 241, Série B, 1957, p. 93-145.

(6) E. W. JOHNS et J. A. V. BUTLER, *Biochem. J.*, 84, 1962, p. 436-439.

(7) L. V. GOFSHTEIN, V. I. SAFONOV et N. M. SISAKYAN, *Dokl. Akad. Nauk. URSS*, 167, 5, 1966, p. 1168-1170.

(8) J.-C. AUTRAN et A. BOURDET, *Comptes rendus*, 271, Série D, 1970, p. 2050-2053.

(9) J.-C. AUTRAN et A. BOURDET, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2732-2735.

(10) S. PANYIM et R. CHALKLEY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 1-2, 1969, p. 337-346.

(11) J.-C. AUTRAN, *Thèse Université Paris-VI*, AO 8677, 1973, 107 pages.

(12) E. W. JOHNS, D. M. P. PHILLIPS, P. SIMSON et J. A. V. BUTLER, *Biochem. J.*, 77, 1960, p. 631-636.

Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés,  
INRA, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris.

## Résumé de la publication paru dans les Chemical Abstracts

143029d **Uniqueness of wheat germ histone composition.** Autran, Jean C.; Boudet, Albert (Lab. Rech. Qual. Bles, Inst. Nat. Rech. Agron., Paris, Fr.). *C. R. Acad. Sci., Ser. D* 1973, 277(22), 2553-6 (Fr). Wheat germ histones were isolated by fractional pptn. with Me<sub>2</sub>CO, chromatographed on CM-cellulose, and sepd. into 7 fractions by electrophoresis. The 4 principal components were purified and, on the basis of their physico-chem. properties and amino acid compns., were named, using the nomenclature of Jones et al., as follows: F<sub>2</sub><sup>a1</sup> (glycine-arginine rich histone), F<sub>2</sub><sup>a2</sup> (arginine-lysine rich histone), F<sub>2</sub><sup>b</sup> (serine-lysine rich histone), and F<sub>1</sub> (very lysine-alanine rich histone). Although these components were very similar to those from other plants and animals, the wheat germ was unusual in the almost complete absence of group F<sub>3</sub> histones and in the low ratio (2.86) of lysine to arginine in the F<sub>1</sub> histone contrasted to the ratio of 10-15 found in thymus or pea histones. R. W. Holton