

LES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES ET LES HISTONES DU GRAIN DE BLÉ. ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE (1)

J.-C. AUTRAN

avec la collaboration technique de Ginette GOBIN

*Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I. N. R. A.,
E. N. S. M. I. C., 16, rue Nicolas Fortin,
75013 Paris*

RÉSUMÉ

Des désoxyribonucléoprotéines et des histones purifiées ont été isolées de différentes régions du grain de blé et particulièrement du germe. Pour ce qui est de la composition chimique et des propriétés physiques, on observe une grande similitude entre ces protéines et leurs homologues animales. En revanche, l'étude de l'hétérogénéité électrophorétique met en évidence une certaine originalité des histones du blé. Ces protéines restent cependant peu évolutives et leur intérêt au plan de la génétique des blés demeure limité. Les histones constituent, par contre, une voie d'approche particulièrement féconde en physiologie végétale, en raison de leur rôle fondamental au niveau de la répression de l'activité des gènes.

Mots clés : *blé, histone, nucléoprotéines, physiologie.*

I. — INTRODUCTION

Depuis toujours, les hommes ont été frappés par la remarquable possibilité des êtres vivants de se reproduire identiques à eux-mêmes. Une telle invariance reproductive ne peut matériellement s'expliquer que par l'existence d'une unité biologique renfermant la totalité des informations nécessaires et assurant le contrôle et la régulation du phénomène. On sait aujourd'hui que cette unité biologique est constituée par les acides nucléiques et particulièrement par l'ADN.

Comment expliquer alors que, dans un organisme supérieur, une cellule différenciée, qu'elle soit nerveuse, sanguine ou glandulaire, puisse posséder la totalité de l'information de l'individu tout en n'en utilisant que la très faible partie nécessaire

(1) Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat d'État ès-Sciences naturelles préparée sous la direction de M. A. BOURDET, Directeur de Recherches à l'I. N. R. A., et soutenue le 20 juin 1973 à l'Université de Paris VI, sous la présidence de M. R. ULRICH, Professeur.

à sa fonction ? Comment expliquer que tel gène, bien que présent dans tout l'organisme, n'exerce son activité que dans telle cellule et non dans telle autre, et encore à certaines occasions seulement ?

Force est donc d'admettre qu'il existe un facteur régulateur qui sélectionne les informations devant être exprimées et qui empêche la transcription des autres. Comme l'a souligné VENDRELY (1967), les meilleurs candidats pour ce rôle de régulateur génique sont actuellement les histones, c'est-à-dire les protéines basiques apparemment associées à l'ADN, sous forme de complexe désoxyribonucléoprotéique, dans les noyaux cellulaires des organismes eucaryotes.

Cependant, malgré les innombrables travaux effectués et les nombreuses hypothèses formulées au sujet de la responsabilité des histones dans la répression de l'activité des gènes, ainsi d'ailleurs que dans le maintien de l'intégrité structurale de la chromatine, il faut reconnaître que la fonction précise des différents composants histones reste encore très mal connue.

Par ailleurs, la majeure partie des travaux antérieurs relatifs aux désoxyribonucléoprotéines et aux histones n'a guère concerné jusqu'ici que le secteur animal et principalement un organe très riche en composés nucléiques, le thymus de veau. Chez les végétaux, la connaissance des histones, qui ne s'est véritablement développée que depuis 1968, demeure très en retard sur celle de leurs homologues animales et a été essentiellement orientée vers les tissus à métabolisme intense, peut-être au détriment des organes de réserve.

Il n'était donc pas sans intérêt d'entreprendre une étude physico-chimique des désoxyribonucléoprotéines et des histones d'un organe végétal important tel que le grain de blé. En effet, le blé lui-même n'avait été, de ce point de vue, l'objet d'aucune étude approfondie et, à notre connaissance, aucun travail d'origine française intéressant directement les histones végétales n'avait encore été rapporté.

C'est donc en nous appuyant le plus souvent sur des travaux similaires du domaine animal que nous sommes parvenus à isoler du grain de blé, et particulièrement du germe, les désoxyribonucléoprotéines et les histones. Nous avons déterminé quelques-unes de leurs caractéristiques physico-chimiques afin de dégager des conclusions quant à leur originalité vis-à-vis des protéines animales homologues. Nous avons ensuite appliqué ces données à des études de nature essentiellement physiologique afin de :

- donner un aperçu de l'évolution des histones au cours des transformations physiologiques du grain,
- mettre en évidence leur éventuelle variabilité au niveau de quelques espèces et variétés,
- émettre enfin certaines hypothèses quant au rôle biologique possible de leurs différents composants.

II. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

I. — Échantillons étudiés

En raison des importantes quantités de matériel requises pour les études physico-chimiques, les protéines dont il est fait état ont été le plus souvent isolées du germe de blé industriel. Cette région du grain constitue en effet un matériel idéal en raison de sa faible teneur en substances de réserve insolubles et de sa richesse relative en constituants nucléiques ; contrairement au grain

de blé total qui ne contient que 0,10 p. 100 d'ADN et à l'albumen qui n'en contient que 0,05 p. 100, le germe renferme plus de 1 p. 100 d'ADN.

En revanche, les études physiologiques ont été conduites à partir d'un matériel mieux défini et plus diversifié : grains en cours de maturation et de germination, différents tissus du grain, germes de différents types de blés et de céréales.

2. — Isolement des désoxyribonucléoprotéines (DNP) et des histones

Il a pu être réalisé selon deux principes différents.

L'un fait intervenir un isolement préalable des noyaux cellulaires par pulvérisation du tissu en milieu glycérol, filtration et centrifugation différentielle (sédimentation à 300 g). A partir d'une telle préparation de noyaux, il est alors aisé de séparer les différents constituants nucléaires, comme le montre la figure 1. Si l'on évite toute dégradation enzymatique, ce procédé apparaît très sûr quant à l'isolement de protéines représentatives du matériel nucléaire. Mais son inconvénient est de ne fournir que de très faibles quantités de DNP en raison du faible rendement de l'isolement des noyaux cellulaires, phénomène assez général dans les tissus végétaux, dû aux membranes cellulosiques.

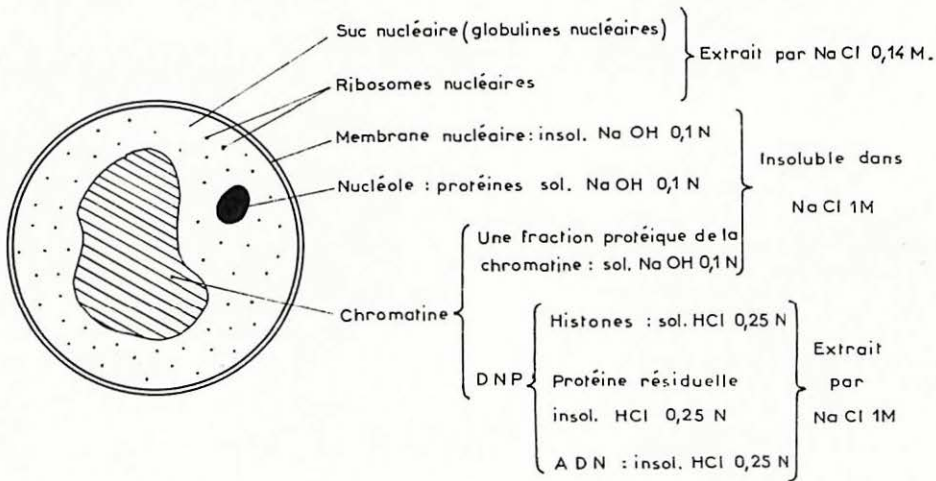


FIG. 1. — Schéma d'un noyau cellulaire. Caractéristiques de solubilité de ses constituants.

L'autre procédé est fondé sur les seules propriétés de solubilité des DNP et utilise le principe de MIRSKY et POLLISTER (1942), c'est-à-dire l'extraction différentielle des ribonucléoprotéines et autres protéines cytoplasmiques en milieu NaCl 0,14 M, puis des DNP en milieu salin concentré. L'intérêt de cette méthode est de conduire à des préparations de DNP très purifiées avec un rendement élevé (de l'ordre de 90 p. 100). Cent grammes de germes permettent donc d'obtenir environ 2,2 grammes de DNP purifiée. En revanche, on ne peut être assuré *a priori* de l'intégrité des DNP isolées, car le séjour en milieu salin concentré est susceptible de provoquer des dissociations entre l'ADN et les histones et, par suite, des réassociations non natives. Notre choix s'est cependant porté en faveur de ce second procédé en raison des rendements élevés qu'il permet et de l'identité apparente entre les protéines obtenues et celles isolées des noyaux cellulaires.

La fraction protéique basique de la DNP, c'est-à-dire l'histone, est alors simplement obtenue par traitement acide des préparations de DNP, la fraction acido-insoluble correspondant à l'ADN et aux protéines dites résiduelles.

3. — Électrophorèse des histones

La séparation électrophorétique est effectuée selon une technique inspirée de celle de PANYIM et CHALKLEY (1969) dans un gel de polyacrylamide préparé par mélange des 3 solutions mères suivantes :

Solution A	{	Acrylamide Eastman Kodak	60 g
		NN'-méthylène-bis-acrylamide	2 g
		Eau distillée q.s.p.	100 ml
Solution B	{	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	5,15 ml
		Acide acétique glacial	43,2 ml
		Eau distillée q.s.p.	100 ml
Solution C	{	Persulfate d'ammonium	0,2 g
		Urée (10 M), soit	60 g
		Eau distillée q.s.p.	100 ml

Le gel est obtenu en réunissant les 3 solutions A, B, C dans les proportions 20, 10, 50, puis en versant le mélange dans un moule démontable de $140 \times 160 \times 3$ mm. Après polymérisation, il est immergé durant une nuit dans 1 litre d'acide acétique 0,9 N également utilisé comme milieu des bacs à électrodes. Sa composition est alors la suivante : Acrylamide 15 p. 100, NN'-méthylène-bis-acrylamide 0,5 p. 100, urée 6,25 M. Le pH est de 3,2.

Après 2 heures de précourant à 7 V/cm, la solution d'histone (concentration 0,75 p. 100 dans l'urée 10 M) est déposée au moyen d'un papier filtre de 10×3 mm inséré dans le gel.

La migration a lieu durant 4 h 30 à 7 V/cm (approximativement 12 mA/cm² de section de gel). La distance de migration est alors voisine de 10 cm.

Les protéines sont colorées durant 30 mn au moyen d'une solution d'Amidoschwarz 10 B à 0,1 p. 100 dans l'acide acétique 7 p. 100 et l'éthanol 20 p. 100. La décoloration s'effectue par immersion dans l'acide acétique 7 p. 100.

4. — Chromatographie d'échanges d'ions

Elle a été réalisée sur colonne de carboxyméthylcellulose. L'échangeur, préalablement purifié par lavages successifs dans NaOH 0,5 N, H₂O, HCl 1 N, H₂O, est mis en suspension dans le tampon formiate de sodium 0,03 M, pH 4,8 (JOHNSON, DRIEDGER et MARKO, 1964), introduit dans une colonne de 25×1 cm, puis lavé par 150 ml de tampon.

On dépose alors sur la colonne 3 ml de tampon dans lequel on a dissous 100 mg d'histone. L'élution est réalisée par 70 ml de tampon, puis par un gradient linéaire de NaCl au moyen d'un dispositif de type Varigrad contenant dans les compartiments 1 et 2 respectivement 100 ml de formiate 0,03 M et 95 ml de NaCl 2 M.

L'absorption de l'effluent est mesurée en continu à l'aide d'un Élugraphe, simultanément à 274,5 nm (histones) et à 260 nm (impuretés nucléiques). Les fractions d'un même pic sont ensuite réunies, précipitées par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 30 p. 100 puis séchées après lavages par l'acétone-HCl et l'acétone.

5. — Précipitation fractionnée par l'acétone

On dissout 250 mg d'histone dans 20 ml d'eau. On y ajoute 3 volumes d'acétone et 0,1 ml d'HCl concentré. Le précipité formé est centrifugé 10 mn à 18 000 tr/mn. Au surnageant obtenu, on ajoute de l'acétone par fractions de 10 ml en séparant par centrifugation le précipité obtenu à chaque opération. En poursuivant jusqu'à 8-10 volumes d'acétone on obtient, à partir de l'histone totale, une succession de fractions de constitutions différentes.

6. — Méthodes analytiques diverses

L'azote total est dosé selon la méthode de Kjeldahl avec le catalyseur CuSO₄-K₂SO₄ (1/10).

Les acides aminés sont séparés et dosés à l'auto-analyseur Technicon, selon la méthode de MOORE et STEIN (1954).

Dans le cas d'un matériel purifié, les acides nucléiques sont déterminés par hydrolyse perchlorique, spectrophotométrie ultraviolette et colorimétrie du désoxyribose. Dans le grain de blé et ses différentes régions, on a effectué la moyenne des résultats fournis par quatre méthodes distinctes de détermination, comme nous l'avons rapporté antérieurement (AUTRAN et BOURDET, 1971 a).

III. — CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

1. — *Composition chimique des DNP*

Les DNP purifiées renferment 40 p. 100 d'ADN, 1,5 p. 100 d'ARN et 58 p. 100 de protéines dont les $\frac{3}{4}$ sont acido-solubles (histones) et le $\frac{1}{4}$ acido-insoluble (protéines résiduelles). La proportion d'ADN est du même ordre de grandeur que chez les DNP animales. La reproductibilité de cette valeur de 40 p. 100 entre différentes expériences et même divers procédés semble constituer un argument en faveur du fait que la « désoxyribonucléoprotéine » ainsi isolée n'est vraisemblablement pas un artefact de préparation tel qu'un mélange d'ADN et de protéines ayant, par hasard, précipité simultanément, mais bien une nucléohistone dont l'intégrité physico-chimique est respectée.

La faible teneur en ARN (1,5 p. 100) existe toujours dans les préparations de DNP. Nous ignorons s'il s'agit ici d'une impureté résiduelle ou si cet ARN est normalement impliqué dans la structure de la DNP tel que l'ARN de la chromatine signalé par BONNER et HUANG (1966), qui serait responsable de la reconnaissance des sites de l'ADN.

2. — *Caractéristiques de solubilité des DNP*

Les DNP du germe de blé, tout comme leurs homologues animales, apparaissent solubles à la fois en milieu salin concentré et dans l'eau pure et présentent donc un minimum de solubilité pour les concentrations isotoniques de la cellule (NaCl 0,14 M). Les solutions de DNP présentent toujours une viscosité très élevée et leur précipitation se produit généralement sous forme d'épaisses fibres. En outre, ces solutions présentent une intense absorption ultraviolette. Le spectre, qui traduit simultanément la présence d'ADN et de protéines, apparaît en fait très proche de celui d'un ADN pur car le coefficient d'extinction des histones est environ 80 fois plus faible que celui de l'acide nucléique. Toutefois, le maximum d'absorption de la DNP reste inférieur d'environ 17 p. 100 à celui de l'ADN libre, du fait de l'existence probable de liaisons entre les histones et l'ADN, entraînant, pour les groupements chimiques impliqués dans l'absorption, un moindre degré de liberté.

Finalement, pour ce qui est des différentes propriétés physico-chimiques dont nous venons de faire état, on ne peut que conclure à une grande similarité entre les DNP de germe de blé et les complexes homologues étudiés jusqu'ici chez de nombreux tissus animaux et chez quelques végétaux.

3. — *Composition des histones*

L'analyse des histones, c'est-à-dire des fractions basiques isolées par traitement acide de la DNP, met en évidence un taux d'azote de 15,8 p. 100 et donc, en principe, une pureté protéique proche de 100 p. 100. Toutefois, comme cela fut déjà rapporté dans le cas du thymus de veau, les préparations contiennent des traces d'ARN et de phosphore, élément dont l'origine pourrait être recherchée notamment dans les formes phosphorylées de certains acides aminés tels que la sérine.

Si l'on étudie la composition en acides aminés, on note, comme chez les autres histones, une grande richesse en acides aminés basiques (25 p. 100 des acides aminés totaux) et une absence quasi totale de cystéine et de tryptophane. Ce dernier caractère explique l'allure particulière du spectre ultraviolet : contrairement à celui de protéines classiques, telles que la sérumbalbumine dont le maximum se situe à 278 nm, celui de l'histone de germe est à 274,5 nm, car il est essentiellement le fait de la tyrosine.

Toutes ces propriétés caractérisent en fait la plupart des histones. Elles ne mettent pas vraiment en évidence d'originalité pour l'histone de germe de blé. D'où l'intérêt d'examiner à présent les résultats fournis par les techniques de fractionnement.

4. — Constitution protéique des histones

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide met en évidence (fig. 2), pour l'histone de germes, 7 composants principaux, contrairement à l'histone de thymus de veau prise habituellement comme référence, qui n'en possède que 4 ou 5. Ces derniers sont d'ailleurs aisément identifiables d'après les travaux de FAMBROUGH et BONNER (1969) et de PANYIM et CHALKLEY (1969). Selon la nomenclature de JOHNS *et al.* (1960), on retrouve les fractions : F_3 dimère, F_1 , $F_3 + F_2b$, F_{2a_2} et F_{2a_1} , respectivement par ordre de mobilité croissante. Selon la nomenclature de LUCK *et al.* (1958), les composants correspondants sont : III dimère, I, III + II_{b1}, II_{b2}, IV.

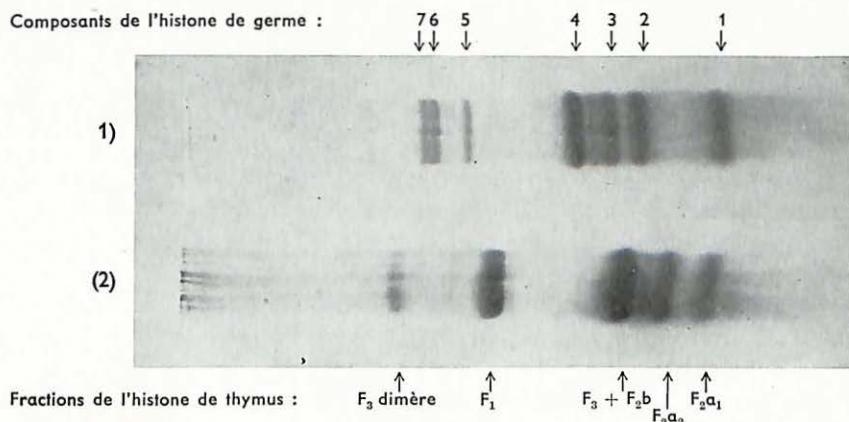


FIG. 2. — Diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide d'une histone de germe de blé (1) et d'une histone de thymus de veau (2)

La constitution de l'histone de germe étant très différente de cette dernière, il est impossible de reconnaître directement ses composants, sauf peut-être dans le cas de la bande frontale qui semble commune aux deux histones. D'où l'idée de tenter d'isoler séparément les différents constituants électrophorétiques afin de les analyser et de conclure quant à leur éventuelle homologie avec des types connus, comme l'ont fait récemment DE LANGE *et al.* (1969) sur l'histone de pois.

Cet isolement a été réalisé ici en conjuguant la chromatographie sur carboxyméthylcellulose et la précipitation fractionnée par l'acétone. Le précipité obtenu

entre 5 et 8 volumes d'acétone correspond ainsi au composant n° 1; le pic 3 de chromatographie de la fraction précipitée entre 3,5 et 4,5 volumes d'acétone s'identifie à la bande n° 2; le précipité recueilli entre 3 et 3,5 volumes d'acétone renferme les composants n° 3 et 4; enfin, le pic 1 de chromatographie regroupe les bandes n° 5, 6, 7.

La figure 3 montre le comportement électrophorétique de ces quatre principaux constituants comparativement à une histone totale et à une histone reconstituée.

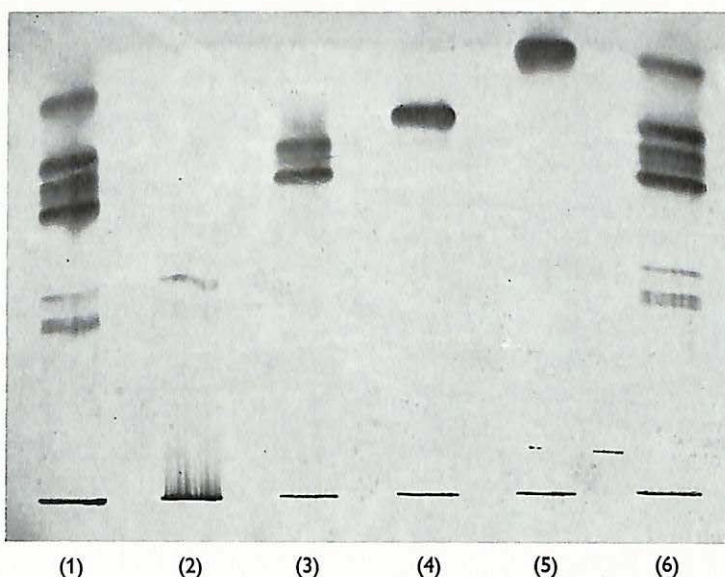


FIG. 3. — Isolement des principaux composants de l'histone de germe de blé
Diagrammes électrophorétiques d'une histone totale témoin (1), des composants de types F₁ (2), F_{2b} (3), F_{2a2} (4), F_{2a1} (5) et d'une histone reconstituée (6).

La composition en acides aminés de ces fractions (tabl. I), ainsi que diverses observations relatives à l'affinité pour l'ADN, au caractère hydrophobe, au rapport e/m de la charge électrique à l'encombrement moléculaire, permettent alors d'identifier, ou plus exactement d'apparenter, ces fractions à des catégories classiques de composants histones.

Ainsi, le composant n° 1, qui apparaît le plus apolaire et le plus fortement lié à l'ADN, présente une mobilité et une composition en acides aminés presque identiques à celles du composant F_{2a1}, ou histone IV. Il faut rappeler que DE LANGE *et al.* (1969) ont trouvé, pour cette histone, des structures primaires extrêmement voisines dans le thymus de veau et dans le pois. Il pourrait bien en être de même avec le germe de blé, ce qui irait dans le sens d'une certaine universalité de cette fraction, même au niveau d'organismes très éloignés.

Des considérations analogues permettent d'apparenter le composant n° 2 au groupe des histones F_{2a2}, bien que l'analogie soit moins étroite qu'avec le type F_{2a1}. Cependant, ce composant apparaît fréquemment associé à une bande de mobilité moyenne qui s'accroît par oxydation et qui s'efface après réduction de l'histone. Cela, associé à la présence de traces de cystéine dans le composant n° 2, suggère qu'une

fraction de type F₃, ne figurant chez le germe qu'à l'état de traces, puisse exister, soit sous une forme dimère (oxydée), soit sous une forme monomère (réduite) qui viendrait contaminer le composant n° 2, dans nos conditions d'électrophorèse.

TABLEAU I

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

	Histone totale de germe de blé	Bande 1 type « F _{2a1} » ou GAR-histone	Bande 2 type « F _{2a2} » ou ALR-histone	Bandes 3, 4 type « F _{2b} » ou SLR-histone	Bandes 5, 6, 7 type « F ₁ » ou VLAR-histone
Acide aspartique 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	15,3 } B	8,2	9,4	14,8	16,3
Histidine		2,1	2,1	1,9	1,9
Arginine		8,2	12,8	11,6	5,6
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
Polaires (1)	45,6	43,1	44,4	45,7	43,0
Apolaires (2)	29,0	28,8	30,2	28,5	26,5
Pol./Apol.	1,57	1,50	1,47	1,60	1,62

(1) Acides aminés polaires : Asp, Thr, Sér, Glu, Lys, Arg.

(2) Acides aminés apolaires : Pro, Val, Mét, Ile, Leu, Phé.

Le groupe n° 3, 4 apparaît riche en lysine et en sérine. Son dédoublement, son caractère polaire et sa composition en acides aminés permettent de le classer dans le type F_{2b}, encore appelé II_a chez les végétaux.

Enfin, les composants 5, 6, 7, qui constituent le groupe le moins chargé et le moins lié à l'ADN, peuvent être rapportés au type F₁, habituellement très riche en lysine et alanine.

Il apparaît donc, dans l'histone de germe, à la fois des analogies et des dissemblances de constitution avec les histones antérieurement étudiées. Parmi les dissem-

blances, on relève principalement les suivantes. La présence, à l'état de traces seulement, d'histone F₃, pourrait expliquer à la fois une plus grande solubilité et une plus faible affinité pour l'ADN de l'histone de germe. L'absence de type F₁, très individualisé, entraîne l'existence d'un large groupe F₁ + F_{2b} aux propriétés assez homogènes.

Donc, bien que présentant une complexité électrophorétique du même ordre et parfois supérieure à celle de ses homologues végétales et animales, l'histone de germe de blé apparaît faiblement différenciée sur le plan des propriétés physico-chimiques de ses composants.

Comment expliquer cette originalité? Contrairement à BUTLER, JOHNS et PHILLIPS (1968), nous ne pensons pas qu'il faille l'attribuer au caractère embryonnaire du germe, car les histones d'embryon de pois, selon FAMBROUGH, FUJIMURA et BONNER (1968), et de riz (IWAI, 1964) apparaissent normalement différenciées. Il ne semble pas non plus s'agir d'un caractère spécifique des céréales, car les histones de seigle, selon JOHN et NEIL JONES (1970), sont de type classique. Il est donc encore difficile de faire le lien entre ces différentes observations en raison du trop faible nombre de travaux sur les histones végétales.

Dans l'ensemble, cependant, malgré l'originalité de l'histone de germe de blé, l'idée qui se dégage est celle d'une relative similitude avec les protéines homologues des autres organismes végétaux et même animaux. Globalement, les histones apparaissent donc comme des protéines peu évolutives, ce qui permet de penser que la majeure partie de leur structure est indispensable à leur activité biologique. Toute hypothèse visant à élucider cette activité devra donc nécessairement tenir compte de cette caractéristique exceptionnelle.

IV. — ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA CONSTITUTION DES HISTONES

Les différentes observations rassemblées précédemment, particulièrement au sujet de la constitution protéique des histones, ont été appliquées à l'étude de quelques problèmes intéressant la physiologie du grain de blé.

L'intérêt de cet aspect se justifie par le rôle actuellement attribué aux histones dans le contrôle de l'expression des gènes. Les modifications qualitatives ou quantitatives éventuellement apportées à la constitution de ces protéines au cours des transformations physiologiques du grain sont, en effet, susceptibles de fournir indirectement de précieuses informations sur la fonction des histones elles-mêmes ou de certains de leurs composants.

C'est pourquoi, après une étude préalable concernant différents tissus du grain, nous nous sommes intéressés aux phénomènes de maturation et de germination ainsi qu'aux différences d'ordre génétique.

I. — *Histones isolées de différents tissus du grain*

Le protocole d'isolement des DNP et des histones a été appliqué à différents produits de la mouture semi-industrielle du grain, qui correspondent grossièrement à des régions de ce grain : la farine, représentative de l'albumen, les fractions inter-

médiaires, dites remoulages, riches en fractions périphériques et en parois celluloseuses des cellules de l'albumen, les sons, correspondant aux enveloppes externes.

Si l'on examine les protéines acido-solubles isolées des DNP de ces différents tissus, on observe que leur constitution diffère de celle de l'histone de germe ; les différences qualitatives correspondent, d'une part, à la perte des fractions F_1 dans les tissus périphériques ainsi que dans le grain total, perte que l'on pourrait attribuer à une insolubilisation sous l'influence de composés de type polyphénol, au cours des purifications de la DNP. D'autre part, par rapport à ceux de l'histone de germe, les diagrammes renferment des fractions supplémentaires de faible mobilité, que nous avons assimilées, après isolement et analyse des acides aminés, à des globulines nucléaires constitutives du suc nucléaire. Dans le germe, ces protéines sont normalement éliminées en milieu 0,14 M, tandis que dans les autres tissus du grain, en raison de la dégénérescence des cellules qui accompagne la maturation, elles seraient incomplètement extraites et viendraient donc contaminer l'histone.

Si l'on considère alors les seuls composants de nature histone, on ne peut noter aucune différence qualitative, mais tout au plus une différence quantitative entre, par exemple, le germe et l'albumen ; les fractions de mobilité élevée sont relativement moins importantes dans l'albumen que dans le germe. Cette observation rejoint d'ailleurs celles de FAMBROUGH, FUJIMURA et BONNER (1968) qui, dans le pois, notent également que la fraction F_1 est moins représentée dans les organes embryonnaires que dans les organes différenciés.

On a noté, par ailleurs, une relation entre les histones et les fractions protéiques classiques définies selon OSBORNE (1907). Ainsi (fig. 4), les globulines (salino-solubles) de l'albumen du grain renferment une importante fraction histone très proche de celle isolée des DNP. De même, après purification des gluténines de germe, apparaît une fraction histone identique à celle isolée des DNP du même tissu (AUTRAN et BOURDET, 1970).

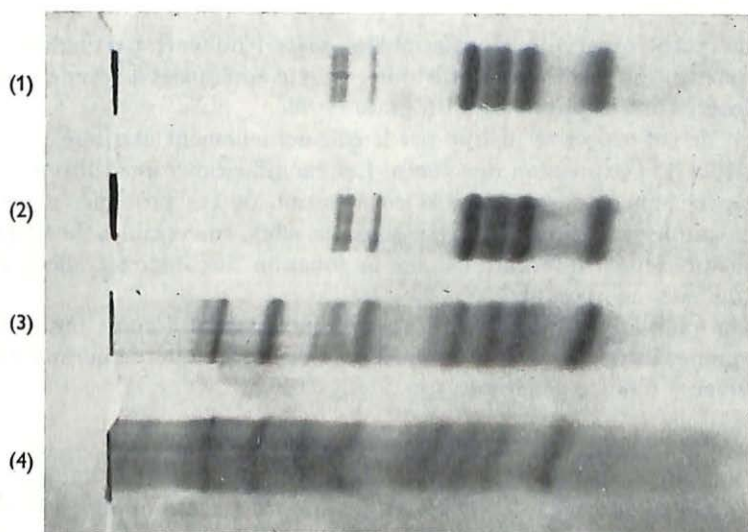


FIG. 4. — Diagrammes électrophorétiques des protéines acido-solubles isolées de DNP de germe de blé (1), de gluténine purifiée de germe (2), de DNP de farine (3) et de globuline non purifiée de farine (4).

En revanche, vraisemblablement en raison des différences d'accessibilité aux solvants de ces différents tissus, ni les globulines de germe, ni les gluténines d'albumen, ni d'ailleurs les fractions albumines et gliadines, ne contiennent d'histone.

2. — *Évolution des histones au cours de la maturation du grain*

L'analyse électrophorétique (fig. 5) des histones isolées de grains en cours de maturation fait apparaître une évolution significative.

Les premiers prélèvements (douzième et seizième jour après la fécondation) ne montrent que des fractions rapides F_{2a} et F_{2b} .

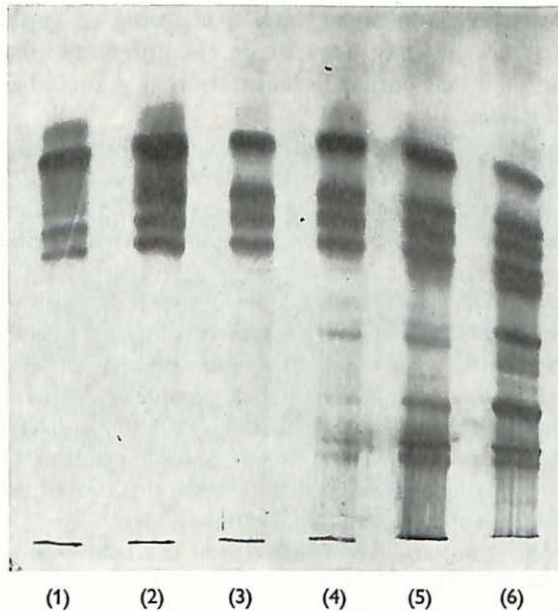


FIG. 5. — Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de grains de blés en cours de maturation
Nombre de jours après la fécondation : (1) 12 j ; (2) 16 j ; (3) 23 j ; (4) 30 j ; (5) 41 j ; (6) 52 j

A partir du vingt-troisième jour, des composants de faible mobilité commencent à apparaître pour aboutir, au cinquante-deuxième jour (grain mûr) au diagramme classique de l'histone.

Si l'on néglige la contamination inévitable par les globulines nucléaires et dans la mesure où les protéines isolées représentent bien les entités biochimiques mobilisées au niveau de l'ADN, on constate que le jeune grain est pauvre en histones et que les nouvelles fractions (type F_1) n'apparaissent que vers les derniers stades de la maturation.

On peut donc imaginer que le ralentissement des synthèses lié à la maturation du grain s'accompagne d'un accroissement des protéines appelées à réprimer les nombreux gènes dont l'activité est devenue inutile et même nuisible pour la plante. En outre, ces protéines apparaissent essentiellement représentées par des histones F_1 .

Ces observations s'accordent donc à celles de FAMBROUGH, FUJIMURA et BONNER (1968) en ce sens que les fractions les plus riches en arginine (type F_{2a}), qui n'apparaissent pas influencées par la maturation, pourraient jouer un rôle dans la structure de la chromatine ainsi que dans la répression permanente de certaines séquences de l'ADN. Inversement, les histones F₁, plus riches en lysine, pourraient être responsables d'une répression temporaire. Leur rôle serait donc essentiellement fonctionnel ; elles sembleraient constituer des outils efficaces de régulation de l'activité des gènes.

3. — *Évolution des histones au cours de la germination*

Cette étude a été réalisée à la fois à partir de grains en cours de germination normale et d'embryons, préalablement isolés, en cours de germination sur milieu nutritif. L'isolement des histones à partir de ces différents matériels montre que, contrairement à ce qui a lieu durant la maturation, il y a ici abaissement progressif de la quantité d'histones.

Plus précisément, on observe l'évolution suivante. Durant les premières 24 heures, aucun changement n'apparaît, ce qui peut s'accorder avec le fait qu'au cours de cette période il n'y a pas de transcription de nouveaux ARN messagers, la synthèse protéique étant programmée par des ARN messagers déjà transcrits et conservés dans l'embryon sec.

Le deuxième jour, il y a disparition des histones F₁, ce qui pourrait signifier qu'il y ait libération des sites de l'ADN représentant les gènes devant être activés. En fait, il semble très difficile de conclure à partir de cette observation, car le mécanisme de la dérégulation, certainement plus complexe, pourrait faire intervenir, non pas une simple libération des sites, mais plutôt une modification des histones n'impliquant pas leur départ, par exemple par phosphorylation de la sérine, acétylation de la lysine, thiolation, ou encore intervention des protéines non-histones de la chromatine en tant qu'antagonistes des histones.

À partir du troisième jour, il y a disparition des composants F_{2a} et F_{2b}. Selon nous, ce phénomène pourrait correspondre à une hydrolyse, liée à la dégradation des divers constituants des tissus du grain, la présence d'un composant très rapide venant à l'appui de cette hypothèse.

Finalement, après 3 jours de germination, les protéines isolées de la DNP ne correspondent plus qu'aux fractions contaminantes de l'histone (globulines nucléaires), tandis que la réapparition de fractions rapides au quatrième jour traduit certainement le développement en quantité significative des tissus de la plantule. Les histones de ces tissus, que nous avons étudiées séparément, sont d'ailleurs représentées essentiellement par des fractions F_{2a} et F_{2b} et dépourvues de fractions F₁, ce qui confirme l'absence, déjà signalée, de ces histones dans les tissus à métabolisme intense.

4. — *Influence des caractéristiques génétiques*

Cette étude, dont l'objet était de mettre en évidence une éventuelle spécificité génétique des histones, a été réalisée à partir d'une trentaine de variétés des espèces *aestivum*, *compactum* et *durum* du genre *Triticum*, puis étendue à quelques autres genres (*Hordeum*, *Secale*, *Aegilops*).

Comme nous l'avions précédemment rapporté (AUTRAN et BOURDET, 1971 *b*), la comparaison des diagrammes électrophorétiques de ces histones montre qu'entre variétés d'une même espèce (fig. 6) aucune différence significative ne peut être relevée.

Si l'on compare différents genres, on n'observe que des dissemblances limitées et intéressant les seules fractions F_1 . Les autres fractions (F_{2a} et F_{2b}) ne présentent aucune spécificité au niveau de ces genres de végétaux. Donc, contrairement à quelques travaux déjà anciens (JOHNS et BUTLER, 1962 ; VENDRELY, GENTY et COIRAULT, 1965), qui laissaient entrevoir une certaine spécificité pour les histones, nos résultats montrent au contraire l'influence très faible des caractéristiques génétiques sur la constitution des histones, ce que confirment plusieurs études très récentes (DE LANGE *et al.*, 1969, 1972 ; SMITH, DE LANGE et BONNER, 1970 ; PANYIM, BILEK et CHALKLEY, 1971 ; SAUTIÈRE *et al.*, 1971).

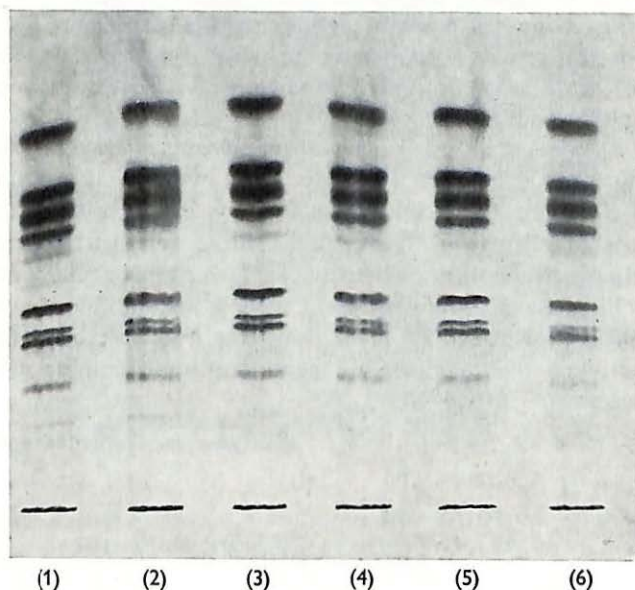


FIG. 6. — Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de germes de différentes variétés de *Triticum aestivum*
(1) *Joss* ; (2) *Cappelle* ; (3) *Capitole* ; (4) *Progress* ; (5) *Atys* ; (6) *Magdalena*

Dans l'ensemble, les histones apparaissent donc peu spécifiques. Plus exactement, les fractions de type F_1 seraient relativement spécifiques, celles de types F_{2b} et F_{2a_2} reflèteraient seulement des différences au niveau des classes, des ordres ou des embranchements, celles de types F_3 et F_{2a_1} pourraient être quasi universelles, même dans leur structure primaire. Ces dernières histones sont certainement sous la dépendance de gènes ne tolérant des modifications que dans des limites très étroites, tout autre mutation étant vraisemblablement létale.

Cette absence de modification évolutive, qui n'a pas d'équivalent dans la nature, ne peut qu'être liée à une importance fondamentale de ces protéines et au caractère

fonctionnel de la quasi totalité de leur molécule. Elles pourraient donc constituer des agents complexants hautement spécifiques de la structure en double hélice de l'ADN, seule donnée biochimique n'ayant pas varié durant l'évolution.

V. — CONCLUSION

L'étude de la constitution des histones ne paraît pas utilisable en chimiotaxonomie des blés courants et ne semble présenter un intérêt, en génétique, qu'au niveau du matériel obtenu par des hybridations éloignées.

En revanche, les histones semblent se prêter à d'intéressantes études physiologiques et nous pensons que ce travail constitue, au niveau des blés, une première base pour le développement des recherches dans ce secteur. Mais de nombreux travaux, à la fois biochimiques et physiologiques, mettant en œuvre des techniques plus complexes et efficaces que les nôtres (établissement de la séquence des acides aminés, reconstitution de la chromatine, emploi d'enzymes de synthèse de l'ADN et de l'ARN, hybridation des acides nucléiques, ...) seront encore nécessaires pour résoudre les nombreux problèmes qui demeurent posés.

Ainsi, il n'est plus possible de concevoir un mécanisme de répression de l'activité des gènes fondé sur la spécificité des molécules d'histones. La compréhension d'un tel mécanisme doit donc tenir compte du fait que, si les histones sont nécessaires pour masquer quantitativement l'ADN de la chromatine, leur effet n'est probablement pas spécifique. On pense actuellement que le véritable agent spécifique pourrait être un ARN chromosomal éventuellement associé aux protéines non-histones. Les histones elles-mêmes ne contribueraient donc pas à la spécificité de la répression et apparaîtraient non plus comme des régulateurs mais comme des outils passifs de cette régulation.

Reçu pour publication en novembre 1973.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. PETIT et LEFEBVRE, de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., Massy, pour les déterminations d'acides aminés ainsi que M. COLAS, des Grands Moulins de Paris, pour la fourniture des germes de blé industriels.

SUMMARY

DESOXYRIBONUCLEOPROTEINS AND HISTONES IN WHEAT KERNELS. PHYSICO-CHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS

Purified desoxyribonucleoproteins and histones were isolated in different parts of wheat kernels and especially of the germ. As to the chemical composition and physical characteristics a great similarity was observed between proteins and the corresponding proteins in animals. On

the contrary the study of electrophoretic heterogeneity reveals an originality of wheat histones. However these proteins show no important evolution, and are little interesting from the point of view of wheat genetic improvement. On the other hand histones allow a very promising approach in plant physiology with respect to their basic role in the repression of gen activity.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE DESOXYRIBONUKLEOPROTEINE UND DIE HISTONE DER WEIZENKÖRNER. CHEMISCH-PHYSIKALISCHE UND PHYSIOLOGISCHE ASPEKTE

Die gereinigter Desoxyribonukleoproteine und Histone von verschiedenen Zonen des Weizenkorns und besonders vom Keim wurden isoliert. In bezug auf die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften beobachtet man eine starke Ähnlichkeit zwischen diesen Proteinen und ihren animalischen Homologen. Die Untersuchung der elektrophoretischen Ungleichartigkeit zeigt jedoch eine gewisse Originalität der Weizenhistone. Diese Proteine entwickeln sich jedoch nur wenig und sie sind vom Standpunkt der Genetik des Weizens von beschränktem Interesse. Die Histone hingegen bieten besonders fruchtbare Untersuchungsmethoden auf dem Gebiet der Pflanzenphysiologie wegen ihrer entscheidenden Rolle bei der Unterdrückung der Gen-Aktivität.

RIASSUNTO

LE DESOSSIRIBONUCLEOPROTEINE E GLI ISONI DEL GRANO DI FRUMENTO. ASPETTI FISICO-CHIMICO E FISIOLOGICO

Delle desossiribonucleoproteine e degli istoni purificati sono stati isolati da diverse regioni del grano di frumento e in particolare dal germe. Per quanto riguarda la composizione chimica e le proprietà fisiche, è stata osservata una grande similitudine tra queste proteine e quelle animali di stesso tipo. D'altra parte, lo studio dell'eterogeneità elettroforetica mostra una certa originalità degli istoni del frumento. Queste proteine restano tuttavia poco evolutive e il loro interesse sul piano della genetica del frumento è limitato. Gli istoni costituiscono invece un mezzo d'avvicinamento particolarmente fecondo in fisiologia vegetale a causa del loro ruolo fondamentale al livello della repressione dell'attività dei geni.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUTRAN J.-C., BOURDET A., 1970. Histones de germes et de farine de blé. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, **271** (22), 2050-2053.
- AUTRAN J.-C., BOURDET A., 1971 a. La détermination des constituants nucléiques du blé et leur répartition dans le grain. *Ann. Technol. agric.*, **20** (2), 179-183.
- AUTRAN J.-C., BOURDET A., 1971 b. Constitution électrophorétique des histones de germes de différents types de blés. *C. R. Acad. Sci., Sér. D*, **272** (21), 2732-2735.
- BONNER J., HUANG R. C., 1966. *The histones*. Ciba Foundation Study Group, n° 24, 18. Churchill J. and A., Ltd, London.
- BUTLER J. A. V., JOHNS E. W., PHILLIPS D. M. P., 1968. Recent investigations on histones and their functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 209-244.
- DE LANGE R. J., FAMBROUGH D. M., SMITH E. L., BONNER J., 1969. Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV. Comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **255** (20), 5669-5679.

- DE LANGE R. J., HOOPER S. A., SMITH E. L., 1972. Complete amino acid sequence of calf thymus histone III. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **69** (4), 882-884.
- FAMBROUGH D. M., FUJIMURA F., BONNER J., 1968. Quantitative distribution of histone components in the pea plant. *Biochemistry*, **7** (2), 575-584.
- FAMBROUGH D. M., BONNER J., 1969. Limited molecular heterogeneity of plant histones. *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 113-122.
- IWAI K., 1964. Histones of rice embryos and of *Chlorella*. In BONNER J., Ts'o P., *The nucleohistones*, 59-65. Holden-day inc. San Francisco.
- JOHN P. C. L., NEIL JONES R., 1970. Molecular heterogeneity of soluble proteins and histones in relationships to the presence of B-chromosomes in rye. *Exptl. Cell. Research*, **63**, 271-276.
- JOHNS E. W., PHILLIPS D. M. P., SIMSON P., BUTLER J. A. V., 1960. Improved fractionations of arginine-rich histones from calf thymus. *Biochem. J.*, **77**, 631-636.
- JOHNSON L. D., DRIEDGER A., MARKO A. M., 1964. Chromatographic behaviour of histones on Sephadex and CMC. *Can. J. Biochem.*, **42**, 795-811.
- LUCK J. M., RASMUSSEN P. S., SATAKE K., TSVETIKOV A. N., 1958. Further studies on the fractionation of calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **233**, 1407-1414.
- MIRSKY A. E., POLLISTER A. W., 1942. Properties of isolated chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **28**, 344.
- MOORE S., STEIN W. H., 1954. Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **211**, 893-906.
- OSBORNE T. B., 1907. *The proteins of wheat kernel*. Carnegie Institution of Washington. Pub. n° 84.
- PANYIM S., CHALKLEY R. C., 1969. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130** (1-2), 337-346.
- PANYIM S., BILEK D., CHALKLEY R., 1971. An electrophoretic comparison of vertebrates histones. *J. Biol. Chem.*, **246** (13), 4206-4215.
- SAUTIÈRE P., TYROU D., MOSCHETTO Y., BISERTE G., 1971. Structure primaire de l'histone riche en glycine et en arginine isolée de la tumeur de chloroleucémie du rat. *Biochimie*, **53** (4), 479-483.
- SMITH E. L., DE LANGE R. J., BONNER J., 1970. Chemistry and biology of histones. *Physiol. Reviews*, **50** (2), 159-170.
- VENDRELY R., GENTY N., COIRAULT Y., 1965. Étude comparée des histones d'érythrocytes chez diverses espèces animales. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **47** (12), 2233-2240.
- VENDRELY R., 1967. Données récentes sur les histones. *Pathol. Biol.*, **15** (1-2), 71-77.
-