

Université de Sherbrooke

Points de contact entre les protéines HMG 1 et 2 et les histones
dans la chromatine et leur niveau de poly(ADP-ribosylation).

par

Louise Deschênes

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Mars 1990

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-61232-0

TABLE DES MATIERES

Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	ix
Résumé.....	xi
1. Introduction.....	1
1.1 - La chromatine.....	2
1.1.1 - L'acide désoxyribonucléique (ADN).....	2
1.1.2 - Les histones.....	3
1.1.3 - Le nucléosome.....	3
1.1.4 - Etats de la chromatine.....	9
1.2 - La réaction de poly(ADP-ribosylation).....	10
1.2.1 - Structure du polymère poly(ADP-ribose).....	11
1.2.2 - Enzymes impliquées dans la réaction de poly- (ADP-ribosylation).....	11
1.2.3 - Fonction de la réaction de poly(ADP-ribosylation)...	14
1.3 - Les protéines HMG.....	15
1.3.1 - Propriétés générales des protéines HMG.....	15
1.3.2 - Structure des protéines HMG 1 et 2.....	17
1.3.3 - Fonction des protéines HMG 1 et 2.....	18
1.3.4 - Localisation nucléaire des protéines HMG 1 et 2.....	20
1.3.5 - Structure des protéines HMG 14, 17 et I.....	22
1.3.6 - Fonction des protéines HMG 14, 17 et I.....	25
1.3.7 - Localisation des protéines HMG 14, 17 et I.....	27
1.4 - Agents de réticulation.....	34
1.5 - But du travail.....	35
2. Matériel et méthodes.....	37

2.1 - Matériel.....	38
2.2 - Méthodes.....	39
2.2.1 - Extraction des protéines HMG.....	39
2.2.1.1 - Préparation de l'homogénat.....	39
2.2.1.2 - Isolement des protéines.....	39
2.2.2 - Fractionnement de la chromatine.....	43
2.2.2.1 - Isolement des noyaux.....	43
2.2.2.2 - Digestion et fractionnement.....	43
2.2.2.3 - Précipitation à l'acide sulfurique.....	44
2.2.2.4 - Réaction de poly(ADP-ribosylation).....	47
2.2.3 - Réactions de réticulation.....	48
2.2.3.1 - Réticulation dans la fraction DS.....	48
2.2.3.1.1 - Vérification de la présence de la	
liaison HMG-nucléosome dans la	
fraction DS.....	49
2.2.3.2 - Réticulation dans la fraction "noyaux	
digérés".....	50
2.2.3.2.1 - Vérification de la spécificité de	
la liaison HMG-nucléosome.....	51
2.2.4 - Hydrolyse acide des bandes à deux composantes.....	52
2.2.5 - Réticulation en présence des protéines HMG 1 et 2	
exogènes.....	52
2.2.6 - Gels d'électrophorèse.....	53
2.2.6.1 - Gels Laemmli.....	53
2.2.6.2 - Gels AU et AUT.....	54
2.2.6.3 - Gels d'agarose.....	54
2.2.6.4 - Coloration des gels Laemmli et AU (AUT).....	55

2.2.6.4.1 - Coloration au bleu de Coomassie.....	55
2.2.6.4.2 - Coloration à l'argent (AgNO ₃).....	56
2.2.6.5 - Gels Laemmli en seconde dimension.....	56
2.2.6.6 - Coloration des gels d'agarose.....	56
2.2.6.7 - Déterminations densitométriques.....	57
3. Résultats.....	58
3.1 - Extraction des histones du coeur nucléosomal, des histones H1 et des protéines HMG à partir de thymus de veau.....	59
3.2 - Détermination de la fraction de la chromatine appropriée pour la réaction de réticulation.....	59
3.2.1 - Analyse de la taille des chaînes de nucléosomes.....	62
3.2.2 - Analyse électrophorétique des protéines obtenues dans chacune des fractions de la chromatine....	65
3.2.3 - Analyse électrophorétique des protéines ADP-ribosylées.....	68
3.3 - Réactions de réticulation.....	75
3.3.1 - Apparition d'une bande nommée ϕ dans la fraction DS réticulée.....	75
3.3.1.1 - Présence probable d'une liaison électrostatique HMG-nucléosome dans la fraction DS.....	78
3.3.2 - Mise en évidence de la bande ϕ après réticulation dans la fraction "noyaux digérés".....	81
3.3.2.1 - Spécificité de la liaison protéine HMG-nucléosome dans la fraction "noyaux digérés".....	86

3.4 - Hydrolyse acide de la bande ϕ et des témoins d'histones.....	92
3.5 - Disparition des bandes ψ et ω lors de l'ajout des protéines HMG exogènes aux chaînes de nucléosomes.....	103
4. Discussion et conclusion.....	107
4.1 - Extraction des protéines HMG.....	108
4.2 - Réactions de réticulation dans les fractions DS et "noyaux digérés".....	108
4.3 - Hydrolyse acide de la bande ϕ obtenue dans la fraction "noyaux digérés" réticulée.....	112
4.4 - Disparition des bandes ψ et ω lors de l'ajout des protéines HMG 1 et 2 aux chaînes de nucléosomes pour la réaction de réticulation.....	116
5. Remerciements.....	118
6. Bibliographie.....	119

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Modèles détaillés de la structure du coeur nucléosomal.....	4
Figure 2	Modèle proposant l'emplacement de l'histone H1 sur le nucléosome.....	7
Figure 3	Schéma montrant la structure du polymère de poly-(ADP-ribose) et les enzymes impliquées dans sa synthèse et sa dégradation.....	12
Figure 4	Modèle proposé pour démontrer les interactions entre l'ADN et les protéines HMG 1 et 2 dans la chromatine entière.....	23
Figure 5	Modèle représentant la localisation de la protéine HMG 14 sur le nucléosome déterminée par digestion à la DNase 1.....	29
Figure 6	Modèles montrant les modes de liaison des protéines HMG 14/17 sur le coeur nucléosomal.....	31
Figure 7	Schéma résumant l'extraction des protéines HMG à partir de thymus de veau.....	41
Figure 8	Schéma résumant les étapes du fractionnement de la chromatine.....	45
Figure 9	Analyse électrophorétique des différentes fractions obtenues lors de l'extraction des protéines HMG à partir de thymus de veau.....	60
Figure 10	Analyse électrophorétique de la taille des chaînes de nucléosomes retrouvées dans chacune des fractions de la chromatine.....	63
Figure 11	Analyse électrophorétique des protéines retrouvées	

	dans chacune des fractions DS, NCh et NSh de la chromatine66
Figure 12	Electrophorèse en seconde dimension, sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, des différentes fractions de la chromatine après avoir effectué la réaction de poly(ADP-ribosylation).....69
Figure 13	Autoradiogrammes des gels de la migration en seconde dimension des échantillons poly- (ADP-ribosylés) pour chacune des fractions de la chromatine.....71
Figure 14	Electrophorèse en seconde dimension sur gel de polyacrylamide de la fraction DS avant et après la réaction de réticulation en présence d'EDAC.....76
Figure 15	Vérification de la présence d'une liaison élec- trostatique protéine HMG-nucléosome dans la fraction DS.....79
Figure 16	Electrophorèse en seconde dimension sur gel de polyacrylamide de la fraction "noyaux digérés" avant et après la réaction de réticulation en présence d'EDAC.....82
Figure 17	Schéma de l'identification des systèmes à deux composantes formés d'histones du coeur proposé par Boulikas (1988).....84
Figure 18	Vérification de la liaison protéine HMG-nucléosome en présence de différentes concentrations de chloru- re de sodium.....87
Figure 19	Migration électrophorétique des témoins d'histo-

	nes, des protéines HMG 1-2 et de la bande ϕ après hydrolyse acide.....93
Figure 20	Représentation densitométrique du profil de migration électrophorétique de chacun des échantillons hydro- lysés95
Figure 21	Migration en seconde dimension sur gel de polyacry- lamide des chaînes de nucléosomes réticulées en présence ou en absence de protéines HMG.....104

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a.	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
APC	acide perchlorique; HClO_4
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATC	acide trichloroacétique; $\text{Cl}_3\text{C}-\text{COOH}$
AU	acide acétique-urée
AUT	acide acétique-urée-Triton
cADN	acide désoxyribonucléique complémentaire
Ci	curie
cm	centimètre
DNase	désoxyribonucléase
EDAC	1-éthyl-3 (3 diméthylamino propyl) carbodiimide
EDTA	acide éthylène diaminetétra acétique
g	gramme ou coefficient de gravité universelle
His	histidine
HMG	protéine non-histone de groupe de haute mobilité
kb	kilobase
KU	kilo-unité
Lys	lysine
M	molaire
mCi	millicurie
min.	minute
ml	millilitre

mm	millimètre
mM	millimolaire
mmole	millimole
MNase	nucléase micrococcale
N	nucléosome
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
³² P	isotope du phosphore
P	poids
pb	paire de bases
PM	poids moléculaire
REM	rotation par minute
SDS	dodécylsulfate de sodium
TLCK	Na-p-tosyl-L-lysine chlorométhylcétone
Tris	Tris(hydroxyméthyl) aminométhane
ug	microgramme
ul	microlitre
U.V.	ultraviolet
V	volume

Université de Sherbrooke

Points de contact entre les protéines HMG 1 et 2 et les histones dans la chromatine et leur niveau de poly(ADP-ribosylation).

par

Louise Deschênes

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Mars 1990

Résumé

L'interaction des protéines 1 et 2 du groupe de mobilité électrophorétique élevée (protéines HMG) avec l'octamère d'histones à l'intérieur du nucléosome et leur niveau de poly(ADP-ribosylation) ont été étudiés. Extraite de thymus de lapin et digérée par des enzymes, la chromatine a été traitée avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide, lequel catalyse la formation de liens covalents entre les résidus de protéines en contact. Les produits formés par la réaction de réticulation ont été séparés sur un système de gel en deux dimensions acide-urée/ sodium dodécyl sulfates (SDS), excisés et clivés par une hydrolyse acide partielle. Les constituants peptidiques des bandes découpées ont été ensuite identifiés par électrophorèse sur gel de

polyacrylamide en présence de SDS. Les résultats montrent que les protéines HMG 1 et 2 se retrouvent localisées près de l'histone H3 à l'intérieur du coeur nucléosomal. En second lieu, l'interaction des protéines HMG 1 et 2 (extraites de thymus de veau) avec les histones nucléosomales a été étudiée dans un système reconstitué. Les résultats montrent la disparition des produits de réticulation constitués en moitié de l'histone H1 lors de l'ajout des protéines HMG 1 et 2. Ceci suggère le déplacement de l'histone H1 par les protéines HMG 1 et 2 dans la chromatine. Les résultats d'expériences de poly(ADP-ribosylation) montrent que les protéines HMG 1 et 2 peuvent être mono(ADP-ribosylées) comme l'est l'histone H1 et qu'elles se retrouvent presque entièrement dans une seule fraction de la chromatine. Les histones du coeur nucléosomal sont poly(ADP-ribosylées) dans les mêmes conditions expérimentales.

INTRODUCTION

1.1 - La chromatine.

La chromatine est la principale composante du noyau. Elle est composée d'ADN, d'histones et de protéines chromosomales non histones. De l'ARN nouvellement synthétisé peut aussi être associé à la chromatine.

1.1.1 - L'acide désoxyribonucléique (ADN).

L'ADN est formée de quatre bases; adénine (A), thymine (T), guanine (G) et cytosine (C), d'un sucre, le désoxyribose et de groupements monophosphates. Elle code pour l'information génétique responsable de la biosynthèse d'un répertoire de plus de 50,000 protéines différentes pour une seule cellule de mammifère. La structure des ARNs ribosomiaux et de transfert, constituants essentiels pour la biosynthèse des protéines dans le cytoplasme, est aussi encodée par l'ADN nucléaire. Chaque noyau diploïde de mammifère contient 5×10^9 pb d'ADN ce qui représente, si l'ADN est sous forme allongée, 170 cm. Pourtant ces molécules s'accroissent dans un noyau de 0,0008 cm de diamètre. Ceci est possible par 4 niveaux de condensation de l'ADN double hélice qui requièrent l'aide des histones et la participation d'un grand nombre de protéines non histones telles les protéines HMG. (Boulikas, 1987a).

1.1.2 - Les histones.

Il y a cinq principaux types d'histones associées à l'ADN soit les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont toutes des protéines de faible masse moléculaire et chargées positivement dont la structure primaire a été déterminée chez plusieurs espèces. Les histones sont stabilisées dans la chromatine via les interactions électrostatiques de leurs groupements Lys, Arg et His avec les groupes phosphates de l'ADN. On retrouve aussi des interactions hydrophobes, des liens hydrogènes et des interactions électrostatiques histones-histones (Boulikas, 1987a).

1.1.3 - Le nucléosome.

La chromatine possède donc plusieurs niveaux d'organisation dont le mieux défini est le nucléosome. En effet, l'ADN double hélice de mammifère est d'abord organisée en 25 millions de nucléosomes (Boulikas, 1990). Chaque nucléosome consiste en 200 pb d'ADN associées avec les cinq histones (Kornberg, 1974). Le coeur nucléosomal est une particule de 11 X 11 X 5,7 nm, composé d'un octamère d'histones entouré par 1,75 tour (145 pb) d'ADN superhélice à main gauche (figure 1). Suivant le modèle de la figure 1, les histones H2A, H2B, H3 et H4 occupent l'intérieur du nucléosome d'où leur vient le nom d'histones du coeur nucléosomal. Comme la chromatine est une répétition de nucléosomes, on suppose aussi la présence d'un lien d'ADN présent entre les nucléosomes et qui serait, de plus, important pour la liaison de

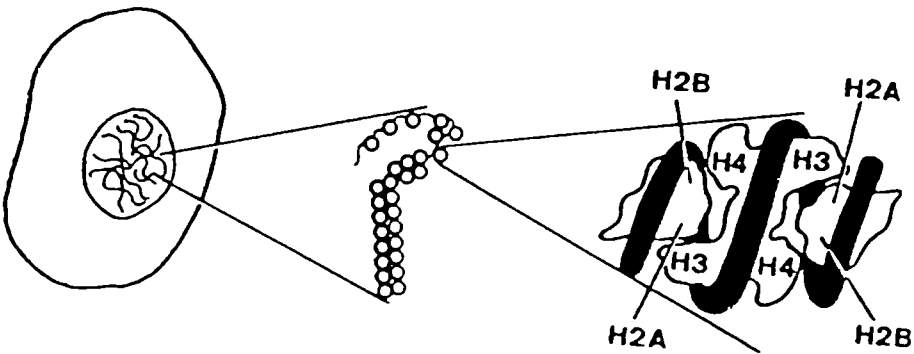
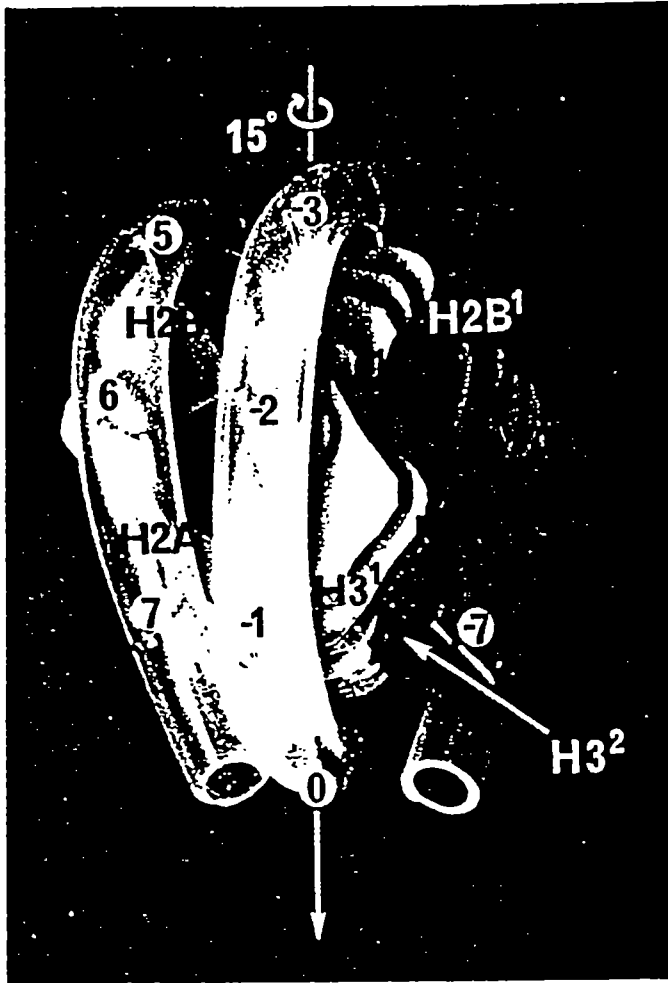
Figure 1

Partie supérieure.

Modèle de la structure du coeur nucléosomal proposé par Klug et al. (1980). L'ADN double hélice est représenté par un tube de plastique. Les nombres -7 à +7 indiquent les distances le long de l'ADN pour montrer les 14 tours de la double hélice contenus dans les 146 paires de base d'ADN. La position des nombres correspond approximativement aux sites de clivage par la DNase I. L'octamère d'histones se présente dans l'ordre H2A¹ - H2B¹ - H4¹ - H3¹ - H3² - H4² - H2B² - H2A².

Partie inférieure.

Organisation des histones dans le noyau selon TAN (1989).



l'histone H1. Notons que l'histone H1, non pas les histones du coeur nucléosomal, peut être préférentiellement relâchée de la chromatine par extraction avec 0,5 - 0,6M NaCl (Boulikas, 1987a). Ce phénomène reflète donc une localisation et une stabilité différentes de l'histone H1 dans la chromatine par rapport à celles des autres histones. Un modèle a été proposé dans lequel l'histone H1 scelle les deux tours d'ADN à son point d'entrée et de sortie du nucléosome (figure 2). Par des expériences de réticulation utilisant le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDAC), Boulikas (1980) a démontré que l'histone H1 est en contact avec l'octamère d'histones du coeur nucléosomal, plus particulièrement avec l'histone H2A. Sur le lien d'ADN, l'histone H1 est donc principalement stabilisée par des interactions électrostatiques avec l'ADN et par formation d'interfaces hydrophobes avec l'histone H2A dans le coeur nucléosomal. Contrairement au coeur nucléosomal qui ne possède pas d'histone H1, le chromatosome contient, en plus de l'octamère d'histones, une copie de l'histone H1 et 167 pb d'ADN.

Constituant le premier niveau de condensation de l'ADN (Felsenfeld, 1978), les nucléosomes, à leur tour, forment les structures secondaires, tertiaires et quaternaires encore mal comprises de l'ADN afin de construire les stades intermédiaires de la chromatine condensée jusqu'au chromosome retrouvé durant la mitose. Enfin, il y a évidence pour soutenir l'idée que la chromatine, dans les cellules eucaryotes, est de plus organisée en domaines, chacun contenant 50 à 1000 nucléosomes (10 à 200 kb d'ADN). Ceci est possible par la fixation en boucle de la chromatine à un élément squelettique appelé la matrice

Figure 2

Modèle proposant l'emplacement de l'histone H1 aux points d'entrée et de sortie de l'ADN du nucléosome. Les trois nucléosomes sont ici considérés comme étant une partie d'un solénoïde contenant 6 nucléosomes par tour. Les acides aminés 40 à 116 (segment hydrophobe) sont en contact avec l'octamère d'histones du coeur nucléosomal tandis que les segments N- et C- terminaux interagissent avec le lien d'ADN. Ce lien contient 40 paires de base et forme 0,5 tour faisant ainsi alterner de 180° l'histone H1 à l'intérieur du solénoïde. Ce modèle a été proposé par Boulikas en 1979.

nucléaire (Hancock et Boulikas, 1982) qui est formée par une série spécifique de protéines non histones (Paulson et Laemmli, 1977; Hancock et Hughes, 1982). Dans une boucle de chromatine, les nucléosomes peuvent être arrangés en ligne, sous forme de solénoïde ou de supersolénoïde.

1.1.4 - Etats de la chromatine.

La chromatine peut se présenter sous trois états différents; soit sous forme de chromatine transcriptionnellement active (gènes spécifiques au type cellulaire, gènes représentés en ARNm), de chromatine transcriptionnellement inactive ou de chromatine inactive mais potentiellement active (gènes inductibles) (Boulikas, 1987b).

La chromatine transcriptionnellement inactive est sous forme condensée et est souvent en contact avec l'enveloppe nucléaire (Fakan et Bernhard, 1971) tandis que la chromatine transcriptionnellement active est sous forme décondensée et est préférentiellement digérée par la DNase 1 dans les noyaux intacts (Weintraub et Groudine, 1976). L'histone H1, connue in vitro pour condenser la chromatine (Renz et al., 1977), existe en quantité minimale ou même est totalement absente des fractions de la chromatine active. Ainsi, les chromatines transcriptionnellement et potentiellement actives peuvent être plus accessibles aux nucléases à cause du plus grand nombre de molécules de nucléases accessibles par nucléosome dans la chromatine dispersée (fraction active) que dans la chromatine condensée (fraction inactive).

Goodwin et al. (1979) et Jackson et Rill (1981) ont démontré que les chromatines transcriptionnellement et potentiellement actives sous forme de mononucléosomes représentent une fraction soluble sous conditions ioniques physiologiques, dénuée d'histones H1 et enrichie en protéines HMG. Enfin, un haut taux d'histones du coeur nucléosomal acétylées, spécialement pour H3 et H4, peuvent être associées avec la chromatine active (Chahal et al., 1980).

Il existe donc des variations dans la structure des nucléosomes. Cette variation est due à la présence des formes multiples des histones, à des modifications post-transcriptionnelles variées se produisant sur des sites spécifiques dans la structure primaire des histones et à la fixation des protéines non histones, principalement les protéines HMG aux nucléosomes.

1.2 - La réaction de poly(ADP-ribosylation).

La réaction de poly(ADP-ribosylation) peut être envisagée comme étant une modification post-transcriptionnelle telle que la méthylation et l'adénylation des protéines. Ce qu'il y a de particulier cependant, est que les résidus formés n'affectent pas seulement la fonction de la protéine cible à travers les modifications covalentes. En effet, par leur longueur hétérogène, leur complexité et leur charge, ces résidus peuvent aussi agir indépendamment sur d'autres molécules de façon non covalente.

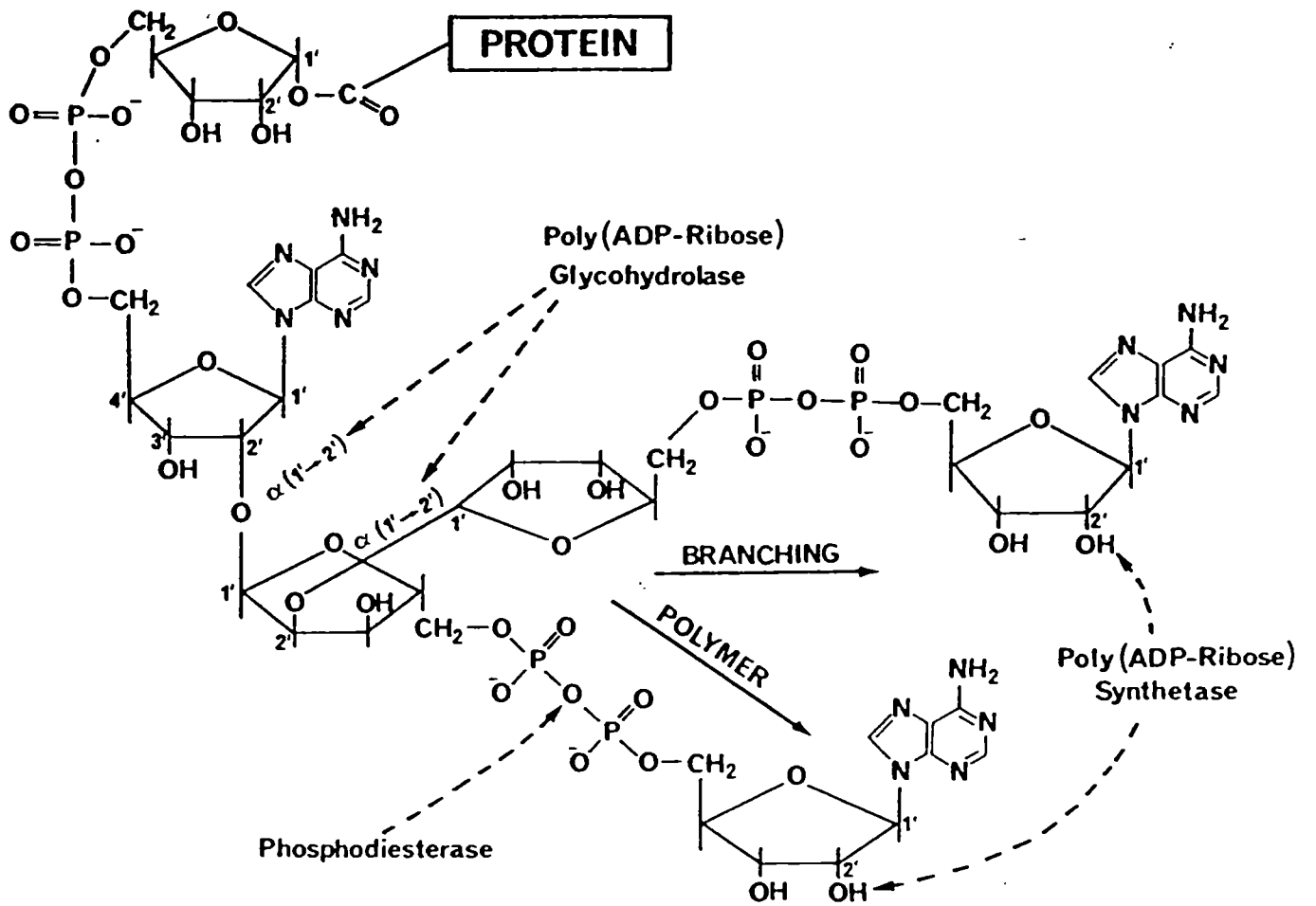
1.2.1 - Structure du polymère poly(ADP-ribose).

Durant cette modification, le groupement adénosine diphosphate ribose du NAD^+ est enzymatiquement transféré aux histones et à d'autres protéines. La figure 3 présente la nature chimique du polymère ainsi que les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de ce dernier (Boulikas, 1988). La structure primaire du poly(ADP-ribose) a d'abord été élucidée par le groupe de Mandel (Chambon et al., 1966; Doly et Peter, 1966). Les groupements poly(ADP-ribose) sont attachés à la protéine via l'atome d'oxygène des groupements carboxyliques des résidus d'acide glutamique ou des groupements carboxy-terminaux pour former des liens O-glycosides (Mandel et al., 1982). Il y a introduction de 1,7 charge négative pour chaque ADP-ribose ajouté (pH 7,0). Deux réactions sont alors présentes soit l'élongation qui forme un squelette ribose α (1' - 2') ribose-phosphate-phosphate et le branchement qui se produit à chaque 30 à 50 résidus via un lien α (1' - 2') ribose-ribose (Miwa et al., 1981). Par contre, plus récemment, les résultats de Boulikas (1989) et de Boulikas et al. (1990) démontrent que, sur l'histone H2B, le polymère est branché à chaque dizaines de résidus d'ADP-ribose. Néanmoins, le polymère poly(ADP-ribose), retrouvé dans les cellules eucaryotes, constitue des chaînes de longueurs variables allant de 2 à plus de 200 résidus (Hayashi et al., 1983).

1.2.2 - Enzymes impliquées dans la réaction de poly-

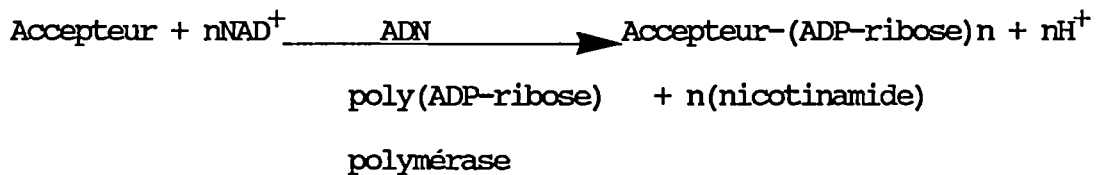
Figure 3

Schéma montrant la structure du polymère de poly(ADP-ribose) et les enzymes impliquées dans sa synthèse et sa dégradation (Boulikas, 1987a).



(ADP-ribosylation).

L'enzyme responsable de la formation du polymère soit de la monomodification du groupement carboxylique, de l'élongation subséquente et du branchement est la poly(ADP-ribose) polymérase. Elle a été purifiée dans divers tissus. En résumé, le schéma de base des réactions de la poly(ADP-ribose) polymérase est le suivant:



Les enzymes poly(ADP-ribose) glycohydrolase (Ueda et al., 1972; Miwa et al., 1974) et ADP-ribosyl protéine lyase (Oka et al., 1984), sont normalement présentes dans les cellules eucaryotes et dégradent le polymère de poly(ADP-ribose) (Figure 3).

1.2.3 - Fonction de la réaction de poly(ADP-ribosylation).

Parmi les accepteurs pour les produits de réaction, on retrouve les histones (Yoshihara et al., 1981), les protéines HMG (Reeves et al., 1981), la topoisomérase I (Ferro et Olivera, 1984), la DNA ligase II (Yoshihara et al., 1984a et 1985b) ainsi que la polymérase elle-même (Kawaishi et al., 1981). D'autres auteurs ont également démontré que les histones du coeur nucléosomal étaient poly(ADP-ribosylées) dans des

noyaux et des nucléosomes (Giri et al., 1978; Hultesky et al., 1985). Une caractéristique commune des accepteurs semble être leur capacité d'interaction avec l'ADN. Notons à ce fait que plus de 95% de la réaction de poly(ADP-ribosylation) est confinée au compartiment nucléaire. L'évidence biologique suggère que cette réaction est impliquée dans les fonctions majeures de la chromatine telles que la réparation de l'ADN (Boulikas, 1989), la réplication et l'activité transcriptionnelle (Althaus et Richter, 1987).

Enfin, d'un point de vue technique, les protéines HMG et les histones peuvent être visualisées par autoradiographie après incubation des noyaux avec du NAD^+ marqué au phosphore-32. Cette méthode demeure donc une façon utile de vérifier la présence ou l'absence de ces protéines dans diverses fractions de la chromatine.

1.3 - Les protéines HMG.

1.3.1 - Propriétés générales des protéines HMG.

Les protéines HMG sont parmi les protéines non histones les plus abondantes. (Butler et al., 1985). Leur nom abrégé provient de protéines non histones de groupe de haute mobilité et indique leur migration rapide sur gel de polyacrylamide (Boulikas, 1987a). Ces dernières se retrouvent chez les animaux, les plantes et les champignons (Spiker et al., 1978; Weber et Isenberg, 1980; Mayes,

1982). Les protéines HMG ont été isolées initialement de thymus de veau (Goodwin et al., 1973). Sur une base opérationnelle, les protéines HMG peuvent être largement définies comme étant des protéines solubles dans 2% (P/V) ATC ou dans 5% (V/V) APC; associées à la chromatine, elles peuvent être extraites par 0,35 M NaCl. Comme les histones, les protéines HMG sont aussi sujettes à des modifications post-transcriptionnelles.

Chez les mammifères, il y a sept principales protéines dans cette classe dont les protéines HMG 1,2,14,17 et 20. La protéine HMG 20 est l'ubiquitine. On retrouve aussi les protéines HMG I et HMG Y. Les nombres manquants dans cette littérature étaient originellement assignés à des bandes qui ont été plus tard identifiées comme étant des produits de protéolyse (Boulikas, 1987a). D'après leurs masses moléculaires et leurs propriétés biochimiques, les protéines HMG sont regroupées en 2 familles soit les protéines HMG de hautes masses moléculaires; les HMG 1 et 2 (Mr: 26 000 - 29 000), et les protéines HMG de basses masses moléculaires; les HMG 14, 17 (Mr: 9 000 - 10 500) (Stros et al., 1985), I et Y. Les protéines HMG 1 et 2 ont une charge nette négative opposée à la charge nette positive des protéines HMG 14 et 17. Ces deux groupes de protéines ont été associés avec les régions de la chromatine transcriptionnellement active (Levy et al., 1979). Les deux protéines HMG de basses masses moléculaires, HMG I et HMG Y, constituent un groupe de protéines qui diffèrent des protéines bien caractérisées, HMG 14 et HMG 17 (Karlson et al., 1989). La protéine HMG I, aussi connue sous le nom de protéine α (Stauss et Varshavsky, 1984), est la plus étudiée de ce groupe. Notons, de plus, que la

protéine désignée HMG Y par Lund et al. (1983) est un isoforme de cette dernière (Lehn et al., 1988).

Enfin comme on retrouve 10^5 à 10^6 copies de chacune des protéines HMG par noyau cellulaire, soit 1 protéine HMG à chaque 5 à 10 nucléosomes, ces dernières composent donc la majeure classe de protéines non histone. C'est pourquoi, on croit qu'elles sont impliquées dans la structure de plus haut ordre de la chromatine et non impliquées dans le contrôle spécifique des gènes (Walker et al., 1980a). Par contre, les résultats de Dorbic et Wittig (1987) montrent qu'il y a des protéines HMG 14 et 17 dans la région codante du gène d'ovalbumine du poulet et non en amont du point d'initiation de la transcription. Le rôle des protéines HMG demeure donc assez confus quoique l'ensemble des résultats expérimentaux suggère une activation transcriptionnelle des gènes (voir section 1.3.6).

1.3.2 - Structure des protéines HMG 1 et 2.

Plusieurs protéines HMG 1 et 2 obtenues à partir de thymus de veau ont été séquencées (Walker et al., 1980a). D'autres informations sur la structure primaire de ces protéines proviennent du séquençage des cADNs (Lee et al., 1987; Tsuda et al., 1988). Des études sérologiques suggèrent que les deux protéines diffèrent seulement de 6 à 8% dans toute leur structure et qu'elles sont très conservées à travers différentes espèces (Romani et al., 1979). Leurs structures natives sont approximativement formées de 40 à 50% d'hélice α (Cary et

al., 1976). Un point à noter chez ces protéines est que plus de 50% de leurs résidus d'acides aminés sont chargés. Comme chez les histones, 25% de ces derniers sont basiques. Cependant, au contraire des histones, les deux protéines contiennent aussi 30% d'acides aminés acides (Walker et al., 1980b). Ces résidus sont asymétriquement distribués dans 3 domaines structuraux dont deux, référés aux domaines N-terminal et central, sont basiques. Le domaine C-terminal contient un grand nombre de résidus acides (Reeck et al., 1982; Cary et al., 1983).

1.3.3 - Fonction des protéines HMG 1 et 2.

Le rôle des protéines HMG 1 et 2 dans la structure et le fonctionnement de la chromatine demeure encore peu connu mais, leur capacité d'influencer la stabilité de la double hélice d'ADN (Javaherian et al., 1978, 1979; Yoshida et al., 1984), leur liaison préférentielle à l'ADN simple brin (Isackson et al., 1979; Bonne et al., 1982), leur médiation in vitro à associer les histones en tétramères et en octamères et à les assembler avec l'ADN pour former les nucléosomes (Bonne-Andrea et al., 1984) suggèrent leur implication dans la structure de la chromatine (Stross et al., 1985). Cependant, leur rôle reste mal défini; certains résultats semblent même contradictoires. Par exemple, Waga et al. (1989) ont démontré que les protéines HMG 1 et 2 suppriment l'assemblage du nucléosome à force ionique physiologique, ce qui s'oppose à ce qui a été énoncé précédemment (Bonne-Andrea et al., 1984). Ce résultat pourrait être dû

aux différentes techniques utilisées. Par contre, certains auteurs ont démontré que la liaison des protéines HMG 1 et 2 causerait soit un déroulement (Duguet et De Recondo, 1978), soit une superenroulement local de l'hélice d'ADN (Bonne-Andrea et al., 1984) selon les conditions expérimentales. Il a aussi été noté que la protéine HMG 1 semble reconnaître spécifiquement les structures d'ADN cruciformes. Elle peut donc ainsi jouer un rôle dans la recombinaison génétique ou dans le contrôle de l'expression de gènes spécifiques contenant des séquences palindromes (Bianchi et al., 1986).

En somme, les protéines HMG 1 et 2 pourraient être impliquées dans plusieurs processus nucléaires. Entre autre, elles semblent affecter l'ARN polymérase III en stimulant la synthèse des produits de réaction de cette enzyme soit l'ARN ribosomal 5S et les précurseurs de l'ARN de transfert (Stoute et Marzluff, 1982). Les résultats de Tremethick et Molloy (1986, 1989) sont en accord avec ce résultat en démontrant que les protéines HMG 1 et 2 peuvent stimuler la transcription en agissant sur les promoteurs des ARN polymérases II et III. De plus, même s'il n'existe pas de preuve directe pour les rôles spécifiques de ces protéines, il a été observé que le taux de protéines HMG 2 va de pair avec l'activité prolifératrice des cellules (Seyedin et Klistler, 1979) et que le taux des deux protéines est diminué et même indétectable dans les cellules en terminaison de différenciation (Seyedin et al., 1981). La protéine HMG1 du foie de rat stimule les ADN polymérases lorsque les cellules entrent en phase de synthèse d'ADN (Bonne et al., 1982). Il a été aussi suggéré que la partie C-terminale acide des protéines HMG 1 et 2 (Tremethick et Molloy, 1989) peut être

directement impliquée dans l'activation transcriptionnelle. Cette suggestion provient de la règle de Ptashne (1988) qui énonce que les activateurs transcriptionnels doivent répondre à deux exigences; soit celui de posséder un domaine de liaison à l'ADN et celui d'exposer une surface chargée négativement. Les protéines HMG 1 et 2 possèdent ces deux caractéristiques. Elles se lient à l'ADN (Solomon et al., 1986; Bianchi et al., 1989) et contiennent une portion très acide d'environ 41 résidus d'acides aminés.

Enfin, par le fait que les protéines HMG 1 et 2 lient préférentiellement les simples brins d'ADN, certains auteurs proposent un rôle d'aide pour l'ouverture des deux brins lors de la transcription ou la réplication. Suivant cette suggestion, elles joueraient le rôle de protéines déstabilisatrices d'ADN (Boulikas, 1987a; Waga et al., 1989).

1.3.4 - Localisation nucléaire des protéines HMG 1 et 2.

A cause de leur caractéristique dipolaire, on s'attend à ce que les protéines HMG 1 et 2 entrent simultanément en interaction avec l'ADN et les protéines associées à celle-ci. (Bernués et al., 1986). Par exemple, Isackson et al. (1981) ont rapporté que les protéines HMG 1 et 2 se liaient plus fortement à la chromatine qu'au double brin d'ADN dénué de ses protéines.

Une digestion très douce avec la nucléase micrococcalle produit

un relâchement de mono- et de courts oligonucléosomes enrichis en protéines HMG 1 et 2, mais apauvris en histone H1 ou H1 et H5 selon le tissu utilisé (Jackson et al., 1979; Chambers et Rill, 1984a). Par ce relâchement préférentiel durant les étapes initiales de la digestion, les protéines HMG de hautes masses moléculaires sont probablement liées à la chromatine active et localisées sur le lien d'ADN, de façon similaire aux histones dites "spécifiques au lien d'ADN" soit les histones H1 et H5 (Levy et Dixon, 1978). Une hypothèse a donc été émise suggérant que les protéines HMG 1 et 2 se lient au lien d'ADN et déplacent ainsi l'histone H1, donnant un état de la chromatine qui requiert spécifiquement l'absence de cette histone, c'est-à-dire la chromatine active (Cary et al., 1984).

D'autres résultats ont été obtenus à partir d'expériences utilisant le formaldéhyde comme agent réticulant. Stross et al. (1985) ont démontré qu'approximativement deux molécules de protéines HMG 1 et 2 sont liées par particule nucléosomale dépourvue d'histone H1 et H5 et possédant une longueur d'environ 185 pb. En utilisant les mêmes techniques, aucune liaison n'est observée dans le cas des coeurs nucléosomiaux possédant une longueur d'ADN d'environ 145 pb. Auparavant, par électrophorèse sur gel, il avait été conclu qu'une molécule de HMG 1 et 2 se liait aux 40 pb du lien d'ADN (Schröfer et Bode, 1982). Par des expériences de réticulation photochimique, Bernués et al., (1986) ont démontré que les protéines HMG 1 et 2 interagissent avec le dimère H2AXH2B et aussi avec le tétramère (H3XH4)₂. Dans le second cas, cela semble se faire via l'histone H3.

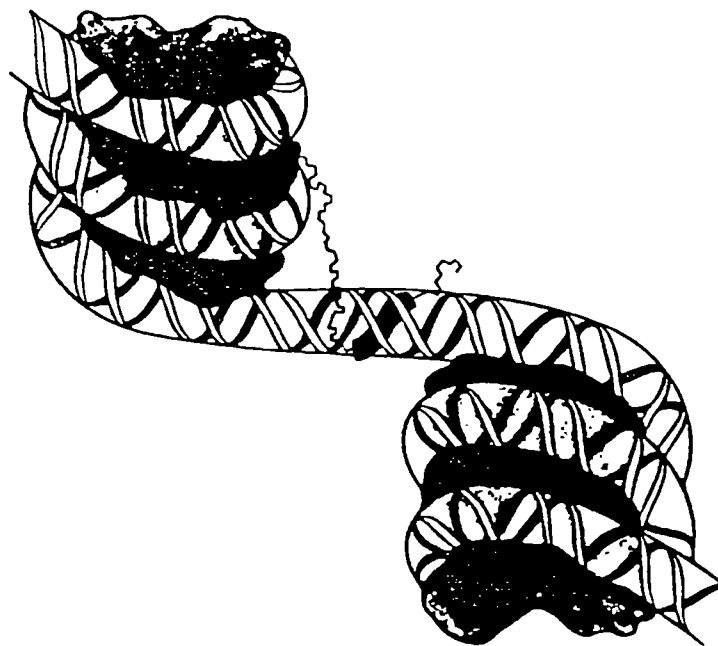
Enfin, par des expériences de réticulation au moyen du cis-diamine dichloroplatine (II), un modèle a été proposé pour montrer les interactions protéine HMG 1, 2-ADN dans la chromatine entière (figure 4).

1.3.5 - Structure des protéines HMG 14, 17 et I.

Les protéines HMG 14 et 17 sont de petites protéines chromosomales structurellement et fonctionnellement très similaires. Elles possèdent peu de groupements non polaires, pas de groupements aromatiques, un grand nombre de résidus proline et 45% d'acides aminés chargés qui sont localisés dans la région centrale basique et la région C-terminale acide (Walker, 1982). Les séquences de ces protéines ont été élucidées par Walker et al. (1977; 1979) à partir de thymus de veau et par Landsman et al. (1986a et b; 1989) à partir de cultures de cellules humaines. Les séquences primaires ont été très conservées durant l'évolution (Landsman et al., 1988; Srikantha et al., 1988). Les protéines HMG 14 et 17 sont enroulées au hasard en solution mais constituent des éléments structuraux plus définis lorsqu'elles sont liées à la chromatine (Bradbury, 1983). La structure primaire de la protéine HMG Y humaine a été établie excepté pour quelques acides aminés situés dans les parties N et C-terminales de la protéine. De plus, il a été observé que cette séquence est identique à celle de la protéine HMG I, à l'exception de seulement 11 acides aminés (Karlson et al., 1989). D'autres informations ont été rapportées par Johnson et al. (1988) telles que la séquence complète du cADN de souris, la structure

Figure 4

Modèle proposé pour démontrer les interactions entre l'ADN et les protéines HMG 1 et 2 dans la chromatine entière (Scovell et al., 1987). Les protéines HMG 1 ou 2 entrent en interaction avec l'ADN dans le sillon majeur de l'ADN internucléosomal. Le schéma montre ici un segment de chromatine contenant deux nucléosomes.



génomique et l'expression tissulaire des protéines HMG-I(Y).

1.3.6 - Fonction des protéines HMG 14, 17 et I.

Les protéines HMG de basses masses moléculaires sont relâchées sélectivement de la chromatine par le traitement des noyaux à la DNaseI sous des conditions qui dégradent préférentiellement les gènes actifs (Vidali et al., 1977; Levy et al., 1977). La présence de ces protéines est apparemment requise pour la sensibilité à la DNase I observée chez la chromatine transcriptionnellement active. De plus, cette sensibilité peut être restaurée en reconstituant la chromatine (lavée préalablement avec 0,35M NaCl) avec des protéines HMG 14 et 17 (Weisbrod et Weintraub, 1979; Gazit et al., 1980). Ces observations ont donc mené à l'hypothèse que ces protéines seraient des protéines structurales dans la chromatine active (Butler et al., 1985) et potentiellement active, et pourraient être impliquées dans quelques aspects de la régulation et de la transcription des gènes (Landsman et al., 1986). En effet, il a été suggéré que les protéines HMG 14 et 17 peuvent conférer des propriétés uniques aux régions de la chromatine contenant des gènes actifs (Landsman et al., 1986).

Cette hypothèse est également appuyée par des expériences de reconstitution avec des nucléosomes isolés (Sandeen et al., 1980), par des expériences qui ont indiqué que la microinjection d'anticorps anti-HMG 17 dans les cellules somatiques inhibe la transcription (Einck et Bustin, 1983), par des études d'immunofluorescence qui ont indiqué

que les anticorps dirigés contre la protéine HMG 14 colorent les régions actives des chromosomes polytènes (Westermann et Grossbach, 1984), par des expériences d'immuno-fractionnement qui ont démontré que les régions de la chromatine enrichies en protéine HMG 17 sont enrichies de gènes transcriptionnellement actifs (Drukman et al., 1986) et d'histones acétylées (Malik et al., 1984) et par des expériences d'immunoprécipitation avec les anticorps spécifiques qui ont montré que cette protéine est associée avec des gènes transcrits activement (Dorbic et Wittig, 1986; 1987). Il apparaît ainsi que les protéines HMG 14 et 17 pourraient maintenir des chaînes de nucléosomes spécifiques dans une conformation transcriptionnellement active. Certains auteurs (Weisbrod et Weintraub, 1981) ont même, en prenant avantage de la spécificité connue d'interaction des protéines HMG 14 et 17 avec la chromatine active, réticulé ces protéines à l'agarose pour en faire une colonne servant à purifier les nucléosomes actifs par affinité.

Cependant, en dépit de tout cela, la fonction des protéines HMG 14 et 17 demeure encore peu connue (Landsman et al., 1989). Enfin, ces deux protéines possèdent aussi une affinité préférentielle pour les simples brins d'ADN. Weisbrod et Groudine (1980) ont suggéré un rôle comme protéines pouvant ouvrir les nucléosomes durant la transcription ou la réplication. Pour ce qui est des protéines HMG I, il a été observé qu'elles se retrouvaient préférentiellement dans les cellules en phase de division active (Lund et al., 1983; Elton et Reeves, 1986). En effet, il a été démontré que les protéines HMG I sont présentes à un niveau élevé dans les cellules en état de prolifération comparé à celui

retrové dans les cellules qui ne se divisent pas. Ce fait amène donc la possibilité de penser que les protéines HMG I peuvent être requises pour la prolifération de certaines cellules (Goodwin et al., 1985).

Selon certaines expériences, il apparaît que les protéines HMG I se lient spécifiquement à la région 3'- non traduite (motif (TATT)_n conservé) du cADN de l'interleukine - 2 de bovin (Reeves et al., 1987) et aux régions riches en A et T retrouvées dans la partie 3'- non traduite des autres gènes de mammifères (Rusnak et al., 1988). Ces protéines HMG pourraient donc jouer un rôle comme régulateur de l'activité post-transcriptionnelle d'une classe spécifique de gènes comprenant ces séquences. Par ailleurs, il a été observé que les protéines HMG I pouvaient jouer un rôle dans la mise en phase des nucléosomes retrouvés dans l'ADN-satellite des singes verts d'Afrique (Solomon et al., 1986), dans les interactions ADN-matrice nucléaire (Elton et al., 1987), dans la condensation de la chromatine métaphasique (Lund et al., 1983) et dans la maturation de la fin 3' des gènes (Reeves et al., 1987; Rusnak et al., 1988). Enfin, Eckner et Birnstiel (1989) ont fait exprimer les cADNs codant pour les protéines HMG I et HMG Y dans une bactérie. A ce moment, les deux protéines se lient spécifiquement à l'octamère ATGC AAAT retrouvé dans la région promotrice des chaînes légères des immunoglobulines suggérant que les modifications post-transcriptionnelles ne sont pas nécessaires pour leur liaison spécifique à l'ADN.

1.3.7 - Localisation des protéines HMG 14, 17 et I.

Plusieurs travaux ont été effectués concernant la localisation des protéines HMG 14 et 17 dans le nucléosome. Des données indicatrices sur la localisation exacte des protéines HMG proviennent d'expériences de digestion à la DNase I de coeurs nucléosomaux enrichis ou non en protéines HMG 14 et 17 (Mardian et al., 1980). La DNase I est connue pour produire une série de coupures à l'intérieur des 146 pb d'ADN entourant le coeur nucléosomal. Après liaison des protéines HMG de basses masses moléculaires, l'activité de l'enzyme est diminuée à deux sites en particulier tandis que les autres sites possèdent une activité qui est augmentée. Les deux sites le long de l'ADN où la diminution de l'activité enzymatique a été observée peuvent alors représenter les sites de liaison des protéines HMG 14 et 17, soit d'environ 20 à 25 pb à partir de chacun des bouts 5' et 3' de l'ADN. Cette association HMG-histones causerait alors une neutralisation partielle des charges positives des histones rendant les régions d'ADN adjacentes plus accessibles à la DNase I (figure 5). Cette localisation a été aussi confirmée par des expériences de réticulation protéine-ADN (Shick et al., 1985) et par des études de dénaturation thermique (Sandeen et al., 1980). Dans ce travail, les auteurs affirment que sur un intervalle considérable de concentration de sel, les deux molécules de HMG 14-17 peuvent être liées fortement mais de façon réversible sur chaque nucléosome.

Par des expériences de réticulation en présence d'iminothiolane, Cook et al. (1986), ont suggéré que la protéine HMG 17 est localisée près du domaine globulaire de l'histone H2A à l'intérieur du nucléosome

Figure 5

Modèle représentant la localisation de la protéine HMG 14 sur le nucléosome déterminée par digestion à la désoxyribonucléase 1. Dans ce modèle, la portion de liaison à l'ADN d'une molécule d'HMG 14 est liée à l'ADN nucléosomal aux sites 1 et 2 (sites 13 et 12 sur le brin complémentaire) et protège cette région de la réaction. La portion acide de la molécule est liée aux histones dans le sillon de la superhélice, neutralisant ainsi leurs charges positives et rendant le tour adjacent de la superhélice plus accessible à la DNase 1. Ceci explique l'augmentation de l'activité enzymatique aux sites 9 et 10 (sites 5 et 4 sur le brin complémentaire). (Mardian et al., 1980).

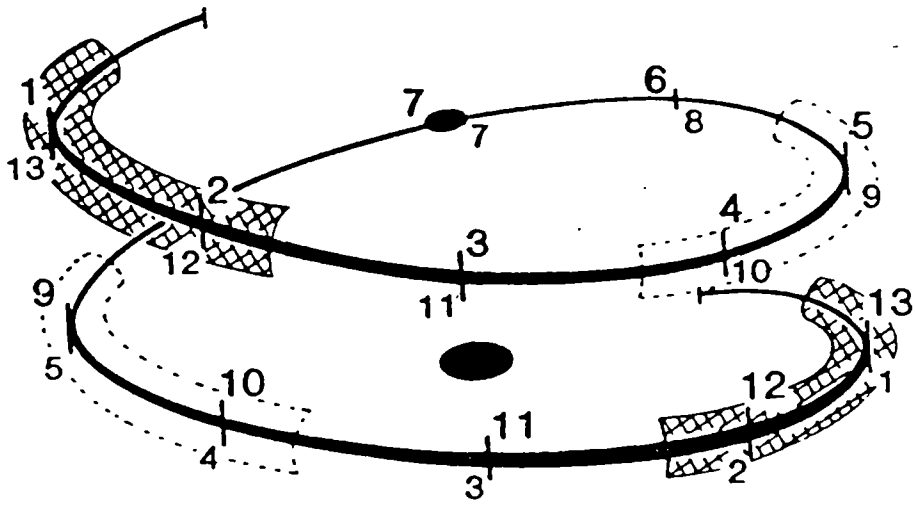


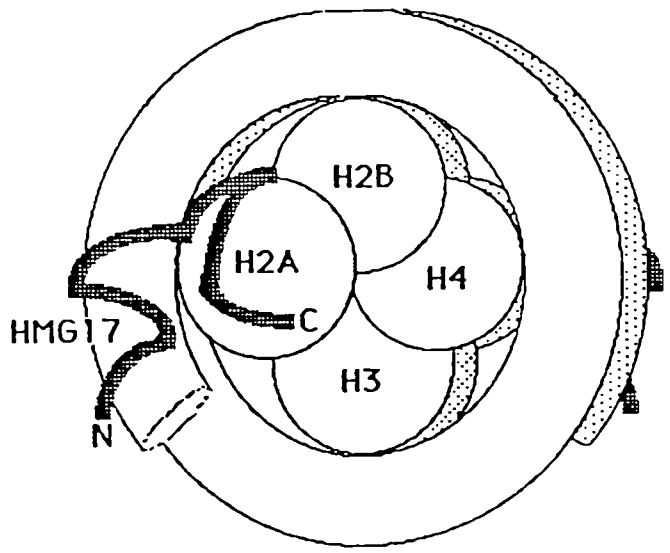
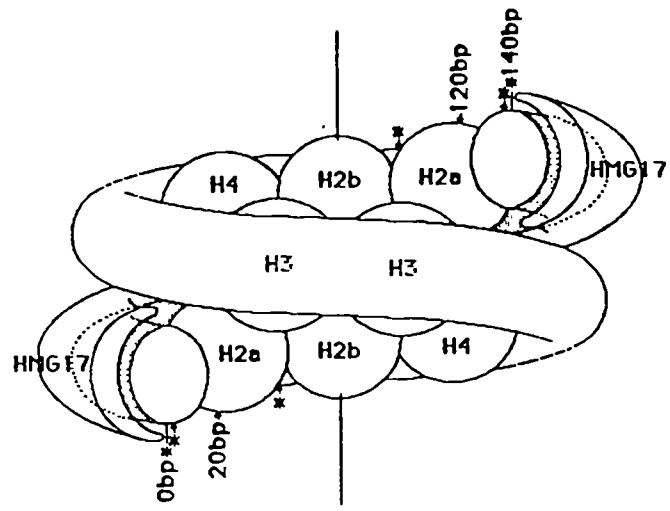
Figure 6

Partie supérieure.

Modèle montrant les sites de liaison de la protéine HMG 17 dans le coeur nucléosomal. Les astérisques montrent approximativement les sites de réticulation HMG 14/17-ADN soit aux positions - 0,25, 125 et 43 paires de base à partir de chaque bout 5' de l'ADN nucléosomal. Les régions pointillées (0 - 20 pb ET 120 - 140 pb) sont protégées de la digestion à la DNase I (Cook et al., 1986).

Partie inférieure.

Modèle montrant le mode de liaison des protéines HMG 14/17 sur le coeur nucléosomal. Le bout terminal COOH de la protéine HMG 17 interagit avec l'histone H2A. Une seconde molécule de HMG 17 se lie à la face opposée du coeur nucléosomal. La longueur du squelette de la protéine HMG 17 n'est pas à l'échelle (Cook et al., 1989).



(figure 6a). En 1989, par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, certains de ces auteurs, (Cook et al., 1989), ont approfondi ces résultats et démontré que la molécule entière de HMG 17 entre en interaction avec le coeur nucléosomal dans ces conditions de force ionique physiologique. La région C-terminale acide se lie plus faiblement à l'ADN tandis que la région centrale basique se lie plus fortement à l'ADN du coeur nucléosomal. Ils concluent alors que c'est le groupe C-terminal de la protéine HMG 17 qui interagit avec l'histone H2A et proposent alors un autre modèle (figure 6b).

En étudiant l'effet de la protéine HMG 17 sur la stabilité thermique des oligonucléosomes, Yau et al. (1983) ont conclu qu'il y avait deux sites de liaison pour la protéine HMG 17 par nucléosome. Ces sites sont localisés entre les points d'entrée et de sortie du nucléosome et la région centrale d'ADN fortement complexée. Les mêmes auteurs ont ensuite démontré qu'il existait aussi deux sites de liaison pour la protéine HMG 17 et ce, par nucléosome contenant des protéines histones acétylées.

Enfin, par des expériences de dispersion de neutrons, Uberbacher et al. (1982) ont démontré qu'il était apparent que la liaison des protéines HMG 14 aux nucléosomes de la chromatine entière est la cause des changements subtils à la conformation de la superhélice d'ADN et que cette liaison ne produit pas de changement majeur au niveau du réarrangement des histones du coeur nucléosomal. Tous leurs modèles montrent une augmentation radiale de la superhélice d'ADN par un léger déroulement de la superhélice. Des techniques de biréfringence de flots

(Harrington et al., 1982) ont aussi démontré l'augmentation radiale de la superhélice d'ADN des nucléosomes comprenant la protéines HMG 14.

1.4 - Agents de réticulation.

La plupart des informations obtenues sur les contacts histone-histone et histone-protéine chromosomale non histone proviennent de réactions de réticulation chimiques effectuées sur la chromatine. Les réactifs les plus utilisés sont ceux communément appelés "agent de réticulation à distance zéro". On retrouve dans cette classe le tétranitrométhane, l'irradiation aux rayons ultraviolets, l'oxydation des groupements sulfhydryles en disulfures et les carbodiimides. Ainsi comme ces agents ne possèdent pas de bras pour lier les deux molécules en contact, il y aura alors établissement d'un lien covalent entre ces deux dernières et ce, seulement si elles se trouvent en contact électrostatique.

L'agent de réticulation utilisé dans le présent travail est le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide ou EDAC. Ce dérivé carbodiimide catalyse principalement la formation de liens amides entre les groupements carboxyliques et amines des protéines qui sont en interaction électrostatique. La capacité des carbodiimides à réticuler les histones dans la chromatine est grandement réduite avec l'accroissement de la force ionique, démontrant ainsi que les groupements réticulés se trouvent à une distance permettant l'interaction ionique (Boulikas, 1987a).

1.5 - But du travail.

Le but du présent travail est d'étudier l'interaction des protéines HMG 1 et 2 avec l'octamère d'histones à l'intérieur du nucléosome et leur niveau de poly(ADP-ribosylation).

A l'aide de l'agent réticulant EDAC, il est théoriquement possible de déterminer la localisation des protéines HMG 1 et 2 sur le nucléosome, à savoir avec quelle histone du coeur nucléosomal ces dernières seront réticulées. Après réticulation, il y aura alors formation d'un dimère. Ce dernier peut être brisé par des techniques de clivage chimique ou enzymatique afin de permettre l'identification de chacune des deux molécules en contact.

En effet, lors de l'ajout de l'agent réticulant à la chromatine, il y aura formation d'un lien amide entre les molécules en contact électrostatique. Par exemple, les histones H2A, H2B, H3 et H4, qui occupent l'intérieur du nucléosome, vont former entre elles une série de systèmes à deux composantes. Les protéines HMG 1 et 2, démontrées à être en interaction électrostatique avec les histones du coeur nucléosomal, devraient donc, à leur tour, former un dimère avec une de ces dernières. Etant donné leurs masses moléculaires plus élevées, les dimères ainsi formés seront facile à situer; leur vitesse de migration sur gel d'électrophorèse sera moins rapide que celle des molécules seules. La bande attendue à contenir à la fois la protéine HMG 1(2) et

une des histone du coeur nucléosomal sera découpée.

Une hydrolyse acide permettra de briser le dimère en plusieurs peptides. En parallèle, des histones et des protéines HMG 1 et 2 de référence subiront le même traitement. En comparant les peptides de clivage obtenus pour chacun des témoins avec ceux obtenus pour la bande découpée, il sera alors possible d'identifier chacun des deux constituants du dimère. Ce résultat va donc permettre l'identification de l'histone du coeur nucléosomal en contact électrostatique avec la protéine HMG 1(2).

MATERIEL ET METHODES

2.1 - Matériel.

Les thymus de veau ont été obtenus à l'abattoir Giroux (Bromptonville) tandis que les lapins proviennent de l'animalerie de la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke

Le bleu de Coomassie brillant R-250, la pyronine Y, le sucrose, le SDS, le bleu de bromophénol et l'agarose (ultra pure DNA grade) ont été fournis par la compagnie Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario. La nucléase micrococcalle, le sulfate de protamine, le 2-mercaptoéthanol, le TLCK et le bromure d'éthidium proviennent de la compagnie Sigma Chemical Co., St-Louis, Missouri. Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide et le Triton X-100 sont de Pierce Chemical Co., Rockford, IL. Le Trizma base et l'acrylamide proviennent de la compagnie Terochem Laboratories Ltd. Toronto, Ontario. Le KCl, la glycérine, l'acide trichloroacétique, l'EDTA et le nitrate d'argent proviennent de la compagnie Fisher Scientific, Montréal, Québec. L'acide perchlorique, le CaCl_2 , l'acétone, le chlorure de sodium et l'acide acétique glacial sont de Produits chimiques BDH ltée, Ville St-Laurent, Québec. L'acide sulfurique et le chlorure de magnésium proviennent de la compagnie J.T. Baker Chemical Co., Philipsburg, New Jersey. Enfin l'acide hydrochlorique provient d'Anachemia Canada Inc., Lachine, Québec et l'urée ultra pure d'ICN Biomedicals Canada Ltée., St-Laurent, Québec.

L'[adénylate- ^{32}P] NAD^+ (activité spécifique de 30 Ci/mmoles) provient de la compagnie Du Pont, Wilmington, Delaware.

2.2 - Méthodes.

2.2.1 - Extraction des protéines HMG.

N.B. Toutes les manipulations s'effectuent sur bain de glace.

2.2.1.1 - Préparation de l'homogénat.

Le thymus de veau de lait fraîchement prélevé (environ 150 g) est d'abord nettoyé de ses tissus sanguins et adipeux. Un volume de 200 ml du tampon X (0,3 M sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ et 0,1% (P/V) de 2-mercaptoéthanol) contenant 30% (V/V) de glycérol est ajouté. Le tissu est ensuite homogénéisé au froid avant d'être passé à travers deux épaisseurs de mousseline. L'homogénat est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

L'homogénat de thymus de lapin est préparé selon la même méthode que celle décrite ci-haut. Cependant, quatre thymus d'environ 4 g chacun sont utilisés et homogénéisés dans 40 ml du tampon X contenant 30% de glycérol. Les thymus proviennent de lapins pesant environ 900 g.

2.2.1.2 - Isolement des protéines.

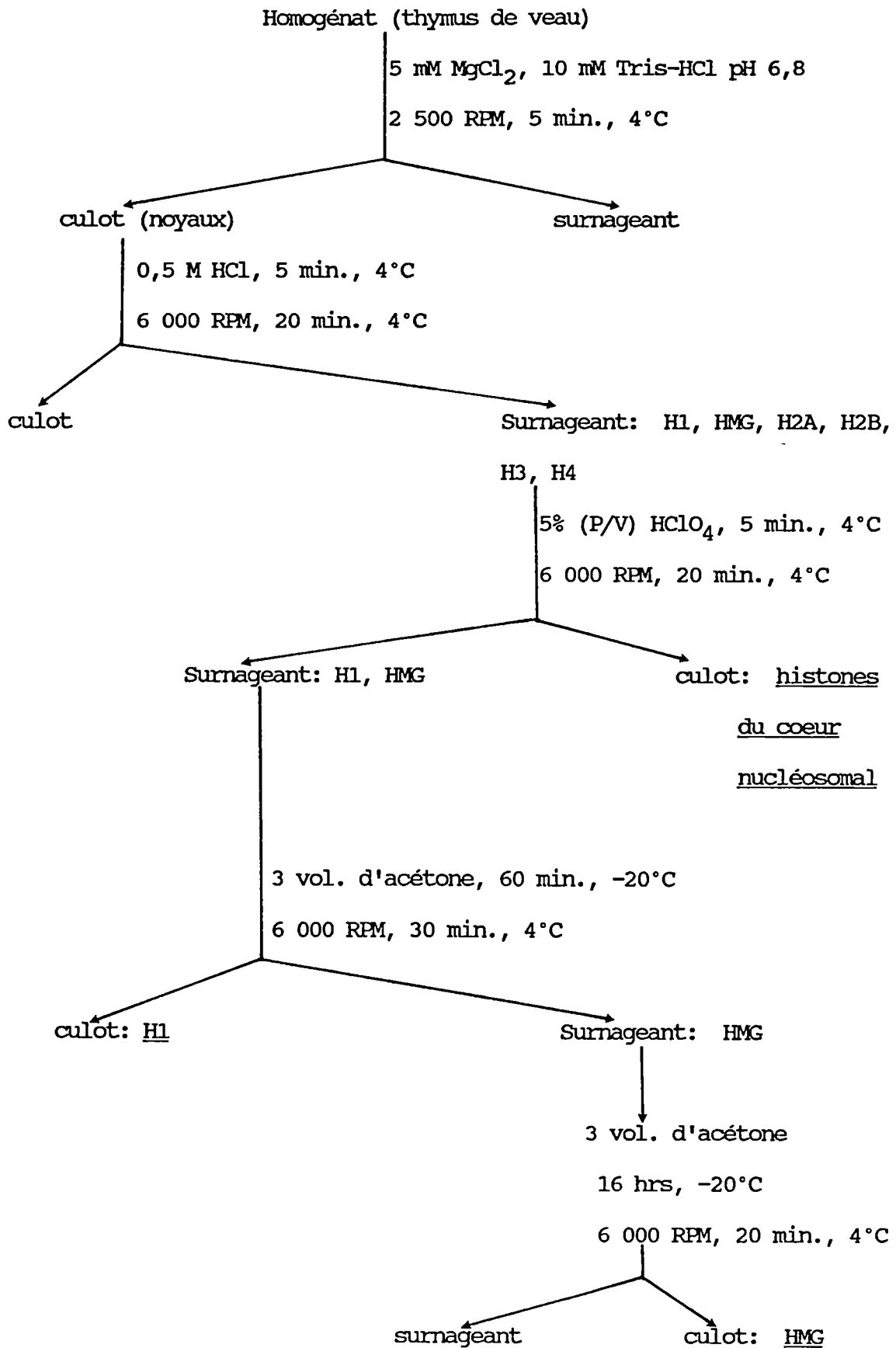
A 25 ml d'homogénat de thymus de veau, on ajoute 100 ml d'une solution A contenant 5 mM $MgCl_2$ et 10 mM Tris-HCl pH 6,8 pour ensuite centrifuger à 2500 RPM pendant 5 minutes. Le culot obtenu (noyaux) est resuspendu dans 30 ml de la solution A et 25 ml d'une solution froide d'acide chlorhydrique 1 M. Après avoir laissé reposer 5 minutes sur la glace, le mélange est centrifugé à 6000 RPM durant 20 minutes.

Dans le surnageant alors obtenu, on retrouve les histones du coeur nucléosomal, les histones H1 et les protéines HMG. Les histones du coeur nucléosomal sont précipitées par un ajout de 5% (P/V) d'acide perchlorique ($HClO_4$). Le mélange est gardé sur glace durant 5 minutes et centrifugé à 6000 RPM durant 20 autres minutes. Au surnageant sont ajoutés 3 volumes d'acétone afin de faire précipiter les histones H1 durant une heure à $-20^{\circ}C$ tandis que le culot contenant les histones du coeur nucléosomal est conservé. Les histones H1 sont obtenues par centrifugation (6000 RPM, 30 min.), tandis que les protéines HMG sont obtenues en ajoutant 3 volumes additionnels d'acétone au nouveau surnageant. Ces dernières précipitent durant la nuit et sont retrouvées dans le culot obtenu après une centrifugation de 20 minutes à 6000 RPM.

Tous les culots obtenus (histones du coeur nucléosomal, histones H1 et protéines HMG) sont lavés 3 fois à l'acétone et séchés sous hotte. Les poudres alors obtenues sont gardées à $-20^{\circ}C$. Pour les analyses électrophorétiques, ces dernières sont dissoutes dans de l'eau distillée (1 mg/ml pour les histones du coeur nucléosomal et les histones H1, 2 mg/ml pour les protéines HMG) et à 2/3 d'un volume de

Figure 7

Schéma résumant l'extraction des protéines HMG à partir de thymus de veau.



ces solutions est ajouté 1/3 du mélange spécifique au gel de Laemmli.

2.2.2 - Fractionnement de la chromatine.

N.B. Toutes les manipulations s'effectuent sur bain de glace.

2.2.2.1. - Isolement des noyaux.

A 0,5 ml d'homogénat de thymus de lapin déposé dans un tube de plastique (Eppendorf), on ajoute 0,1 ml de 10% (P/V) Triton X-100 afin de lyser les cellules. Le tout est mélangé et 0,5 ml d'une solution de tampon X (sans sucrose) contenant 60% (V/V) de glycérol est ajouté pour former un coussin dans le fond du tube permettant de retenir les autres organelles cytoplasmiques. Les noyaux sont alors purifiés par une centrifugation (environ 10 000 x g) de 2 minutes à travers le coussin de glycérol. Le surnageant est alors jeté et les noyaux sont resuspendus dans 0,05 ml de tampon X contenant en plus 2 mM TLCK.

2.2.2.2 - Digestion et fractionnement.

A 0,1 ml de noyaux resuspendus sont ajoutés 11,5 KU de nucléase micrococcale. Le tout est resuspendu et digéré pendant 7 minutes à 37°C. En centrifugeant 2 minutes (10 000 x g), une fraction identifiée DS est obtenue et constitue le surnageant qui contient surtout les

mononucléosomes en solution qui sont préférentiellement clivés par l'enzyme et qui sont enrichis en protéines HMG. Le culot est alors resuspendu dans 0,5 ml d'une solution contenant 2 mM EDTA et 3 mM Tris-HCl pH 6,8. Par cette étape, les chaînes de nucléosomes de longueurs variables (NCh) sont alors relâchées et sont récupérées dans le surnageant par une centrifugation de 2 minutes (10 000 x g).

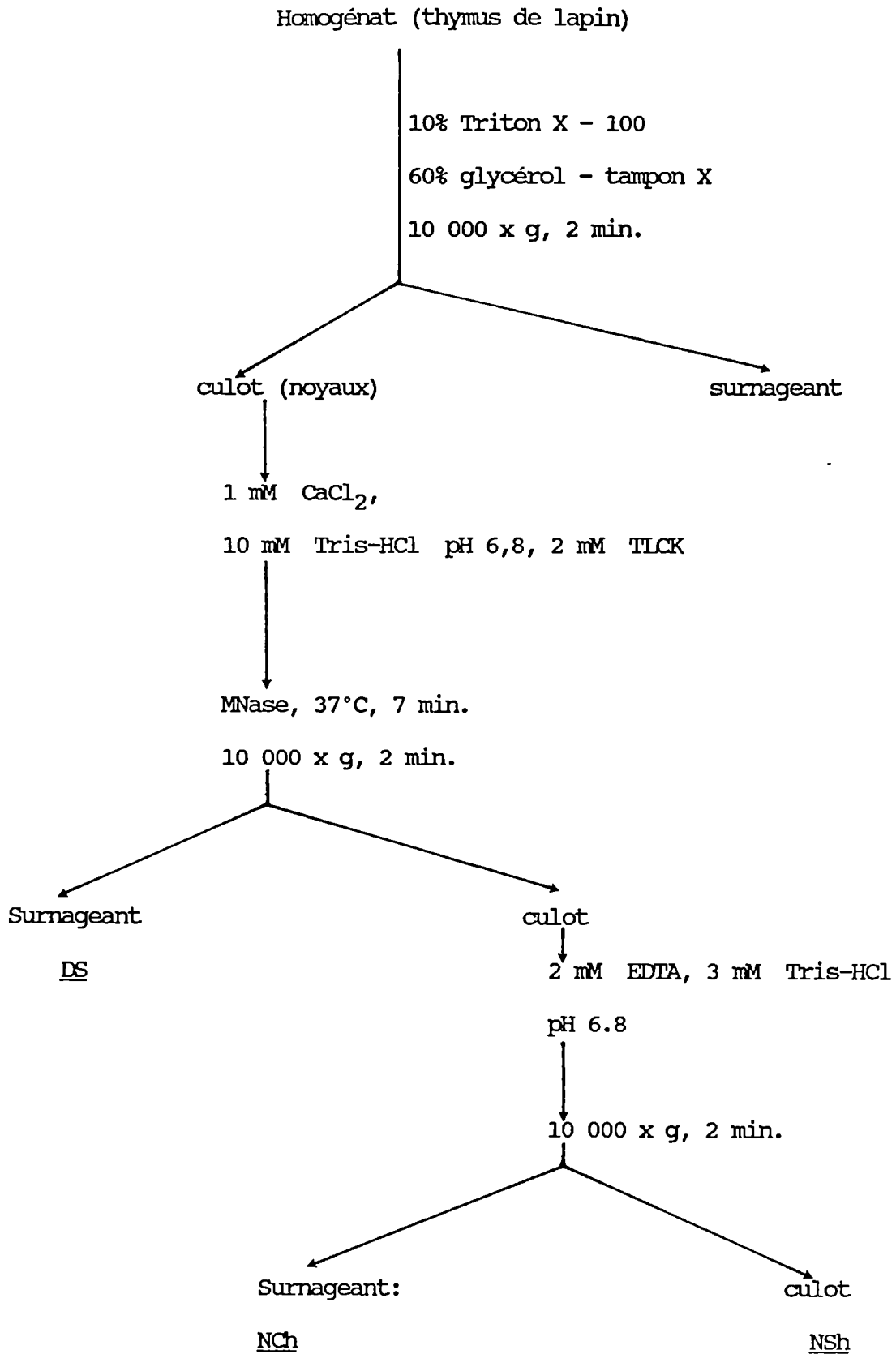
Le culot obtenu, qui contient les chaînes de nucléosomes liées à la matrice nucléaire (NSh), est resuspendu directement dans 0,1 ml du mélange spécifique au gel dans lequel il migrera. Une certaine quantité du mélange spécifique au gel utilisé sera aussi ajouté à une certaine quantité des surnageants DS et NCh lors de leur migration électrophorétique.

2.2.2.3 - Précipitation à l'acide sulfurique.

A 0,05 ml de la fraction DS est ajoutée de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à une concentration finale de 0,26 M. La précipitation s'effectue durant 10 minutes à 0°C. Une centrifugation (10 000 x g) de 5 minutes est alors effectuée. Le culot est lavé à l'acétone et séché. Le surnageant est précipité avec 25% (V/V) d'ATC et le culot obtenu après une centrifugation de 2 minutes (10 000 x g) est aussi lavé à l'acétone et puis séché. Les deux culots finaux sont alors solubilisés dans 0,02 ml du mélange spécifique au gel Laemmli utilisé pour l'expérience.

Figure 8

Schéma résumant les étapes du fractionnement de la chromatine.



2.2.2.4 - Réaction de poly(ADP-ribosylation).

A 0,1 ml d'une préparation finale de noyaux (section 2.2.2.1) placé dans un tube Eppendorf, 11,5 KU de nucléase micrococcale sont ajoutés. Le tout est resuspendu et laissé à 37°C durant 2 minutes sous agitation. Une solution contenant 0,05 ml de 10% (P/V) Triton X - 100, 4×10^{-6} mmole (0,12 mCi) d'[adénylate $-^{32}\text{P}$] NAD^+ , 0,3 mM de NAD^+ , 0,014 ml de tampon X et 3,75 mM de TLCK est alors ajoutée aux noyaux digérés donnant alors un volume final de réaction d'environ 0,25 ml. Ceci correspond à une concentration finale en NAD^+ radioactif de 0,016 mM. Le tout est incubé à température de la pièce durant 15 minutes.

La fraction DS poly(ADP-ribosylée) est obtenue après centrifugation d'une minute (10 000 x g). Cette fraction (surnageant d'environ 0,2 ml) est précipitée par addition d'ATC 25% (V/V) durant 10 minutes à 0°C afin d'enlever le $^{32}\text{P-NAD}^+$ non incorporé. Le culot obtenu après 3 minutes de centrifugation (10 000 x g) est alors lavé à l'acétone et séché. Le culot obtenu après la première centrifugation (noyaux digérés) est resuspendu dans 0,1 ml d'une solution B contenant 2 mM EDTA, 3 mM Tris pH 6,8. Une aliquote de ce mélange (0,015 ml) ci-appelé "noyaux digérés" est alors récupérée pour analyse sur gel de polyacrylamide. Au 0,085 ml restant, 0,9 ml de la solution B est ajouté et le tout est resuspendu afin de permettre la libération des chaînes de nucléosomes. Par une centrifugation de 2 minutes (10 000 x g), les fractions NCh (surnageant) et NSh (culot) sont obtenues. La

fraction NCh est précipitée par addition d'ATC 25% (V/V), lavée à l'acétone et séchée.

2.2.3 - Réactions de réticulation.

2.2.3.1 - Réticulation dans la fraction DS.

Les noyaux sont isolés par la méthode décrite à la section 2.2.2.1, cependant, ces derniers sont resuspendus dans 0,1 ml de tampon X contenant 10% (V/V) de glycérol. De plus, pour cette expérience, 8 tubes Eppendorf, contenant chacun 0,5 ml d'homogénat de thymus de lapin, sont nécessaires aussi bien pour l'échantillon qui sera réticulé que pour l'échantillon témoin.

Les noyaux sont ensuite traités à la nucléase micrococcale soit 11,5 KU/0,1 ml de noyaux durant 7 minutes à 37°C suivi de l'addition de 0,9 ml/tube d'une solution contenant 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 6,8. Le tout est mélangé par pipettage répétitif et laissé sur glace durant 3 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 50 secondes (10 000 x g). Les surnageants (1 ml), qui constituent la fraction DS, sont soigneusement prélevés et remis dans d'autres tubes Eppendorf propres. Les culots obtenus contiennent la fraction nommée "noyaux digérés" et sont utilisés dans les expériences décrites à la section 2.2.3.2.

Pour les échantillons qui seront réticulés, on ajoute 0,03, 0,06, 0,12 et 0,24 ml d'une solution fraîche d'EDAC (150 mg d'EDAC dissous dans 1,5 ml d'eau distillée) à quatre tubes afin d'obtenir les concentrations finales en agent réticulant de 2,7, 5,2, 10 et 18 mg/ml. Cette opération est répétée pour les quatre autres tubes. Dans les échantillons témoins rien n'est ajouté. La réaction de réticulation s'effectue pendant 45 minutes à 22°C. Le contenu de chacun des 16 tubes Eppendorf est ensuite précipité par addition d'ATC 25% (V/V) et les culots obtenus sont ensuite lavés à l'acétone. Durant cette dernière étape, les 8 culots réticulés sont combinés ensemble dans un seul tube. Il en est de même pour les 8 culots servant de témoin. Les 2 culots finaux (échantillon réticulé et témoin) sont alors séchés sous hotte.

2.2.3.1.1 - Vérification de la présence de la liaison HMG-nucléosome dans la fraction DS.

Les fractions DS, NCh et NSh sont obtenues par la méthode décrite à la section 2.2.2. Après migration de ces échantillons sur un gel d'agarose natif et coloration de ce gel d'agarose au bromure d'éthidium, une bande de gel correspondant aux régions mononucléosomale (pour la fraction DS) et polynucléosomale de 2 à 10 nucléosomes (pour les fractions NCh et NSh) est prélevée à l'aide d'une lame. Ceci se fait sous les rayons ultraviolets afin de bien visualiser la localisation du matériel à découper.

Chacune des 3 bandes de gel est broyée dans un tube Eppendorf en présence de 0,05 ml du mélange utilisé pour les gels Laemmli. Les bandes broyées sont incubées ainsi durant 2 heures et centrifugées pendant 10 minutes ou plus (10 000 x g) afin de maximiser le volume de surnageant. Le surnageant total est alors analysé sur un gel Laemmli.

2.2.3.2 - Réticulation dans la fraction "noyaux digérés".

Le début des manipulations est le même que celui décrit à la section 2.2.3.1. Cependant seulement 2 tubes Eppendorf sont nécessaires ici, un pour l'échantillon qui sera réticulé, un pour l'échantillon qui servira de témoin. Ceci s'explique par une plus grande quantité de matériel dans la fraction "noyaux digérés" qui contient à la fois les fractions NCh et NSh.

Les deux culots de noyaux digérés, obtenus à la section 2.2.3.1 sont ensuite resuspendus dans 0,1 ml d'une solution de tampon X contenant 10% (V/V) de glycérol. Neuf cents microlitres de la solution A contenant 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 6,8 sont alors ajoutés et le tout est mélangé. Un échantillon est mis de côté comme témoin tandis qu'on ajoute à l'autre échantillon 0,240 ml d'une solution d'EDAC (150 mg dissous dans 1,5 ml d'eau distillée). La réaction de réticulation s'effectue durant 45 minutes. Les deux échantillons (réticulé et témoin) sont alors centrifugés durant 3 minutes (10 000 x g), lavés avec la solution A et laissés sous la hotte pour sécher. Les culots

sont ensuite solubilisés dans 0,1 ml du mélange AU.

2.2.3.2.1 - Vérification de la spécificité de la liaison HMG-nucléosome.

L'isolement des noyaux (section 2.2.1.2) est effectué à partir de 6 tubes Eppendorf contenant chacun 0,5 ml d'homogénat de thymus de lapin. Chacun des 6 culots de noyaux obtenus est resuspendu dans 0,1 ml de tampon X contenant 10% (V/V) de glycérol. Le tout est digéré à la nucléase micrococcale (11,5 KU) durant 7 minutes à 37°C. Neuf cents microlitres d'une solution A contenant 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 6,8 est ensuite ajouté à chacun des tubes. Le mélange est resuspendu et laissé sur la glace durant 3 minutes. Les tubes sont ensuite mis à centrifuger durant 50 secondes (10 000 x g). Aux culots obtenus (noyaux digérés), 1 ml de la solution A contenant différentes concentrations en chlorure de sodium (NaCl), soit 0, 0,05, 0,14, 0,35, 0,50 et 0,60 M de NaCl, est ajouté à chacun des tubes.

Le tout est resuspendu et centrifugé pendant 50 secondes. Chaque surnageant est soigneusement prélevé et le matériel relâché de la chromatine par les différentes concentrations de sel est précipité par l'ajout de 25% (V/V) d'ATC. Les culots sont lavés à l'acétone pour enlever toute trace d'acide et séchés. Trente microlitres du mélange pour les gels AU sont ajoutés aux culots avant leur analyse sur gel d'électrophorèse.

2.2.4 - Hydrolyse acide des bandes à deux composantes.

A partir des gels bidimensionnels (Laemmli, première dimension et AU, deuxième dimension) contenant la fraction "noyaux digérés" réticulée, la bande ϕ est identifiée et découpée à l'aide d'une lame. Des témoins d'histones du coeur nucléosomal, d'histones H1 et de protéines HMG 1 et 2 sont aussi obtenus d'un gel Laemmli sur lequel ils ont préalablement migré. Toutes les bandes découpées sont alors incubées dans 30 mM d'acide chlorhydrique pendant 3 heures à 105°C. Le tout est ensuite lyophilisé et à chaque tube est ajouté 0,1 ml du mélange spécifique au gel Laemmli. Les échantillons sont chauffés dans de l'eau bouillante durant 3 minutes. Les tubes sont centrifugés (3 minutes, 10 000 x g) et le surnageant est appliqué sur le gel ainsi que la bande de gel (culot) découpée.

2.2.5 - Réticulation en présence de protéines HMG 1 et 2 exogènes.

Les chaînes de nucléosomes (fraction NCh) sont obtenues par la méthode décrite à la section 2.2.2.2. Au départ, 0,5 ml d'homogénat de thymus de veau est suffisant pour produire la quantité de NCh nécessaire à la réaction. Les protéines HMG sont extraites de la façon décrite à la section 2.2.1. Ces dernières sont ici aussi dissoutes dans de l'eau distillée à une concentration finale de 2 mg/ml.

Dans deux tubes Eppendorf sont déposés 128,25 μ l (0,518 mg/ml d'ADN) de la fraction NCh contenant 30% (V/V) de glycérol. Une même quantité de la solution A contenant 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris pH 6,8 est aussi ajoutée à chacun des tubes. Au tube qui servira de témoin sont alors ajoutés 128,5 μ l d'eau distillée. Au second tube, désigné échantillon, seront ajoutés 25 μ l de la solution de protéines HMG (2 mg/ml) et 103,5 μ l de la solution A pour donner un rapport de 3,6 protéines HMG par 200 pb.

Cents autres μ l de la solution A sont alors ajoutés à chacun d'eux ainsi que 10 μ l d'une solution d'EDAC (43 mg d'EDAC/430 μ l d'eau distillée). La réaction de réticulation s'effectue alors durant 45 minutes à la température de la pièce. Une précipitation des protéines est ensuite effectuée à 0° C (15 min.) en ajoutant à chacun des tubes 25% (V/V) d'ATC. Une centrifugation de 3 minutes (10 000 x g) est effectuée après cette étape. Les deux culots ainsi obtenus sont lavés à l'acétone et séchés sous la hotte. Cinquante microlitres du mélange spécifique aux gels AU sont ajoutés à chacun d'eux.

2.2.6 - Gels d'électrophorèse.

2.2.6.1 - Gels Laemmli.

Les gels de polyacrylamide contenant du SDS sont préparés selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Tous ces gels faits en première

dimension possèdent 0,75 mm d'épaisseur. Le mélange ajouté aux échantillons avant leur migration dans ce type de gel est désigné mélange spécifique aux gels Laemmli et est composé de 1,5% (P/V) de SDS, 8 M d'urée, 0,1% de 2-mercaptoéthanol, 0,06 M de Tris-HCl pH 6,8 et 0,01% (P/V) de bleu de Bromophénol.

2.2.6.2 - Gels AU et AUT.

Les gels de polyacrylamide contenant 1 M d'acide acétique, 6 M d'urée et 0,5% (P/V) de Triton X - 100 (gels AUT) sont préparés selon la méthode de Boulikas (Boulikas, 1985b). Le Triton X - 100 peut aussi être absent de ces gels qui sont alors nommés gels AU. Le mélange ici utilisé, pour ces deux types de gels, contient 10 M d'urée, 10 mg/ml de protamine sulfate, 5% (V/V) d'acide acétique, 5 mM EDTA, 1% (V/V) de 2-mercaptoéthanol et 0,01% (P/V) de pyronine Y. Ce mélange est nécessaire pour la solubilisation des histones et de certaines protéines non histones mais ne solubilise pas l'ADN et la plupart des protéines non histones.

2.2.6.3 - Gels d'agarose.

Les gels d'agarose, utilisés pour séparer les oligonucléosomes, contiennent 1% (P/V) d'agarose, 0,1 ou 0,01 X TBE et 0,1% (P/V) de SDS s'il y a lieu. Le tampon d'électrophorèse contient également 0,01 X TBE. Notons ici que le tampon TBE 1 x concentré (1 x TBE) contient

0,089 M de Tris-borate, 0,089 M d'acide borique et 0,002 M d'EDTA (pH 8,0).

Les échantillons migrent à 35 volts durant toute la nuit (16 heures). Le mélange utilisé pour la migration est désigné mélange spécifique aux gels d'agarose et contient 1 X TBE, 80% (V/V) de glycérol et 0,05% (P/V) de bleu de Bromophénol tandis que le mélange pour les gels contenant du SDS contient 1% (P/V) de SDS, 1 X TBE, 10% (V/V) de glycérol et 0,05% (P/V) de bleu de Bromophénol. Pour le gel agarose-acrylamide, il contient 3,5% (P/V) d'acrylamide, 0,5% (P/V) d'agarose et 1 X TBE. Le tampon d'électrophorèse est une solution 1 X TBE qu'il faut renouveler durant la migration à cause du changement de pH dû à la migration des ions. Le mélange utilisé pour les échantillons migrant sur ce type de gel est le mélange spécifique pour les gels d'agarose. Les échantillons sont centrifugés durant environ 1 minute (10 000 x g) avant leur application sur gels (sections 2.2.5.1, 2.2.5.2 et 2.2.5.3), .

2.2.6.4 - Coloration des gels Laemmli et AU (AUT).

2.2.6.4.1 - Coloration au bleu de Coomassie.

Les gels sont d'abord fixés durant 30 minutes dans une solution fixatrice contenant 50% (V/V) d'éthanol et 10% (V/V) d'acide acétique puis colorés durant environ 40 minutes dans une solution 0,2% (P/V) de

bleu de Coomassie R-250, 50% (V/V) d'éthanol et 10% (V/V) d'acide acétique. Les gels sont décolorés dans une solution composée de 15% (V/V) d'éthanol et 5% (V/V) d'acide acétique).

2.2.6.4.2 - Coloration à l'argent (AgNO_3).

La coloration à l'argent s'effectue selon la méthode de Wray et al. (1981).

2.2.6.5 - Gels Laemmli en seconde dimension.

Les gels AU ou AUT en première dimension (0,75 mm d'épaisseur) sont fixés, colorés au bleu de Coomassie et décolorés (section 2.2.6.4) puis équilibrés sous agitation dans de l'eau distillée pour une période d'environ 3 heures. Deux changements d'eau sont effectués durant cette période. Les gels sont finalement incubés pendant 20 minutes dans une solution contenant 2% (P/V) de SDS, 0,1% (V/V) de 2-mercaptoéthanol, 60 mM Tris-HCl pH 6,8 et 10% (V/V) de glycérol. Les bandes des gels sont découpées et placées horizontalement immédiatement sur le dessus d'un gel Laemmli possédant 1 mm d'épaisseur.

2.2.6.6 - Coloration des gels d'agarose.

Les gels sont incubés dans environ 1 litre d'eau distillée

contant 0,5 mg de bromure d'éthidium durant environ 30 minutes. Ils sont ensuite rincés à l'eau distillée, visualisés et photographiés sous lumière ultraviolette.

2.2.6.7 - Déterminations densitométriques.

L'appareil utilisé pour la détermination densitométrique au laser des bandes sur le gel Laemmli coloré au nitrate d'argent est l'Ultrosan XL LKB de la compagnie LKB, Bromma, Suède.

RESULTATS

3.1 - Extraction des histones du coeur nucléosomal, des histones H1 et des protéines HMG à partir de thymus de veau.

La figure 9 présente une analyse électrophorétique des différentes fractions obtenues lors de l'extraction des protéines HMG à partir de l'homogénat de thymus de veau. Dans les puits # 1 et 2 qui contiennent les histones du coeur nucléosomal précipitées à l'acide perchlorique, on remarque la présence des histones H2A, H2B, H3 et H4. La seconde fraction nommée "histones H1" (puits # 3 et 4) contient à la fois l'histone H1A et l'histone H1B. Pour ce qui est de la fraction contenant les protéines HMG (puits 5 et 6), la présence des protéines HMG de hautes masses moléculaires est évidente. Une très petite quantité des protéines HMG 14 et 17 peut aussi être visualisée mais ce, surtout dans le dernier puits. Les protéines HMG 1 et 2 se retrouvent donc en quantité plus abondante que les protéines HMG de basses masses moléculaires.

La présence significative de bandes de protéolyse n'est pas remarquée sauf si ce n'est que d'une toute petite quantité pour les protéines HMG de haute masse moléculaire. Notons que le tissu utilisé doit provenir d'un animal en bas âge, par exemple un veau de lait âgé de 8 mois ou moins dans le cas présent, car le thymus est une glande qui s'atrophie rapidement avec l'âge.

3.2 - Détermination de la fraction de la chromatine appropriée pour la réaction de réticulation.

Figure 9

Analyse électrophorétique des différentes fractions obtenues lors de l'extraction des protéines HMG à partir de thymus de veau.

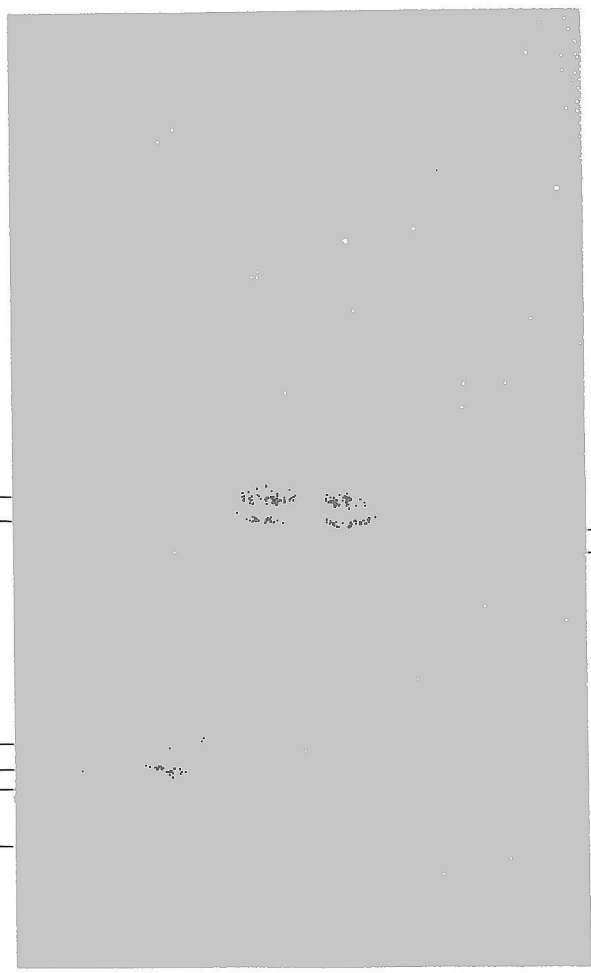
Les protéines ont été extraites suivant les étapes décrites aux sections 2.2.1.1 et 2.2.1.2. Les puits # 1 et 2 contiennent les histones du coeur nucléosomal en quantité de 20 et 25 ug respectivement. Dans les puits # 3 et 4, on retrouve respectivement 20 et 25 ug d'histones H1. Enfin, 30 et 40 ug de protéines HMG ont été appliqués dans les puits # 5 et 6. L'électrophorèse a été faite suivant la technique de Laemmli (section 2.2.6.1) en utilisant 18,3 % d'acrylamide et un gel de 0,75 mm d'épaisseur. Les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie.

1 2 3 4 5 6

H1A
H1B

HMG1
HMG2

H3
H2B
H2A
H4



3.2.1 - Analyse de la taille des chaînes de nucléosomes.

Lors du fractionnement de la chromatine, trois fractions différentes sont aussi obtenues. En analysant leur profil de migration sur des gels d'agarose, on peut déterminer la taille des chaînes de nucléosomes retrouvées dans chacune d'elles.

Dans la fraction NSh (A: puits # 1-4, B: puits h-1) de la figure 10, on retrouve toutes les tailles de chaînes de nucléosomes que ce soit de l'ADN de 145 pb qui entoure le coeur nucléosomal jusqu'aux chaînes beaucoup plus longues d'environ 10 nucléosomes. Les chaînes d'ADN plus longues que ces dernières ne pénètrent pas dans le gel. On remarque, de plus, que la fraction NSh contient principalement de l'ADN correspondant à de petites chaînes de nucléosomes. Etant donné que les conditions dans les gels sont dénaturantes, l'ADN migre seul, dénué de ses protéines.

La fraction NCh (A: puits # 6-9, B: puits a-e) contient aussi une gamme de chaînes d'ADN de longueurs variées. Cependant, plus la chaîne est courte, plus sa quantité tend à diminuer. Par exemple, la présence de mononucléosomes est quasi inexistante dans cette fraction. Il est donc plus facile de visualiser la séparation sur gel de ces chaînes d'ADN de longueurs différentes que celle retrouvée pour la fraction NSh. Dans la fraction DS (A: puit # 5, B: puits f et g), l'absence marquée des longues chaînes de nucléosomes est évidente. La majorité des chaînes retrouvées dans cette fraction correspond à l'ADN

Figure 10

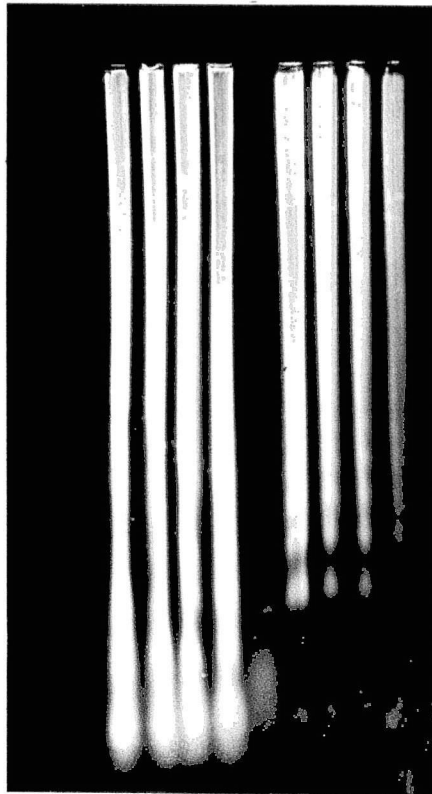
Analyse électrophorétique de la taille des chaînes de nucléosomes retrouvées dans chacune des fractions de la chromatine.

Les migrations électrophorétiques ont été effectuées sur des gels (A et B) contenant 1% (P/V) d'agarose, 0,1 X TBE et 0,1% (P/V) de SDS. Ils ont été colorés au bromure d'éthidium. Ces gels contiennent les trois fractions de la chromatine obtenues suivant les étapes décrites aux sections 2.2.2.1 et 2.2.2.2. Les puits #1 à 4 du gel A contiennent la fraction NSh et ceux numérotés 6 à 9 contiennent la fraction NCh. Seul le puits # 5 contient la fraction DS. Le gel B contient également la fraction NCh (puits a à e), la fraction NSh (puits h à l) et enfin, la fraction DS qui se retrouve dans les puits f et g.

1N = 1 nucléosome (mononucléosome)

2N = 2 nucléosomes (dinucléosome) etc...

A

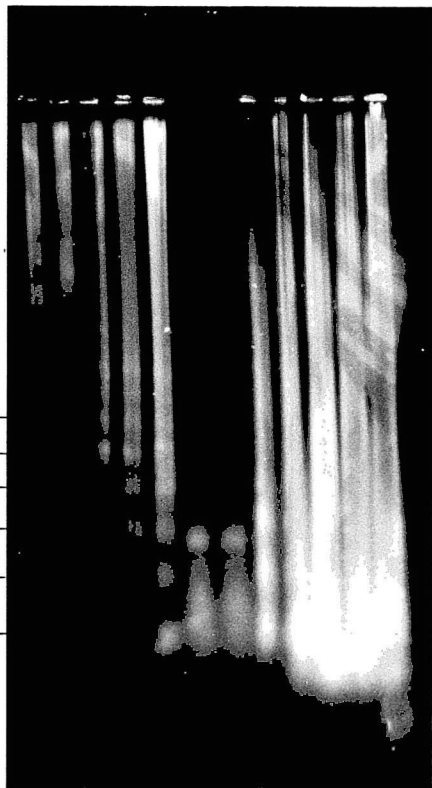


4N
3N
2N
1N

1 2 3 4 5 6 7 8 9

B

a b c d e f g h i j k l



6N
5N
4N
3N
2N
1N

entourant les mono et les dinucléosomes. La définition de chacune des fractions est décrite dans la section 2.2.2.2.

3.2.2 - Analyse électrophorétique des protéines obtenues dans chacune des fractions de la chromatine.

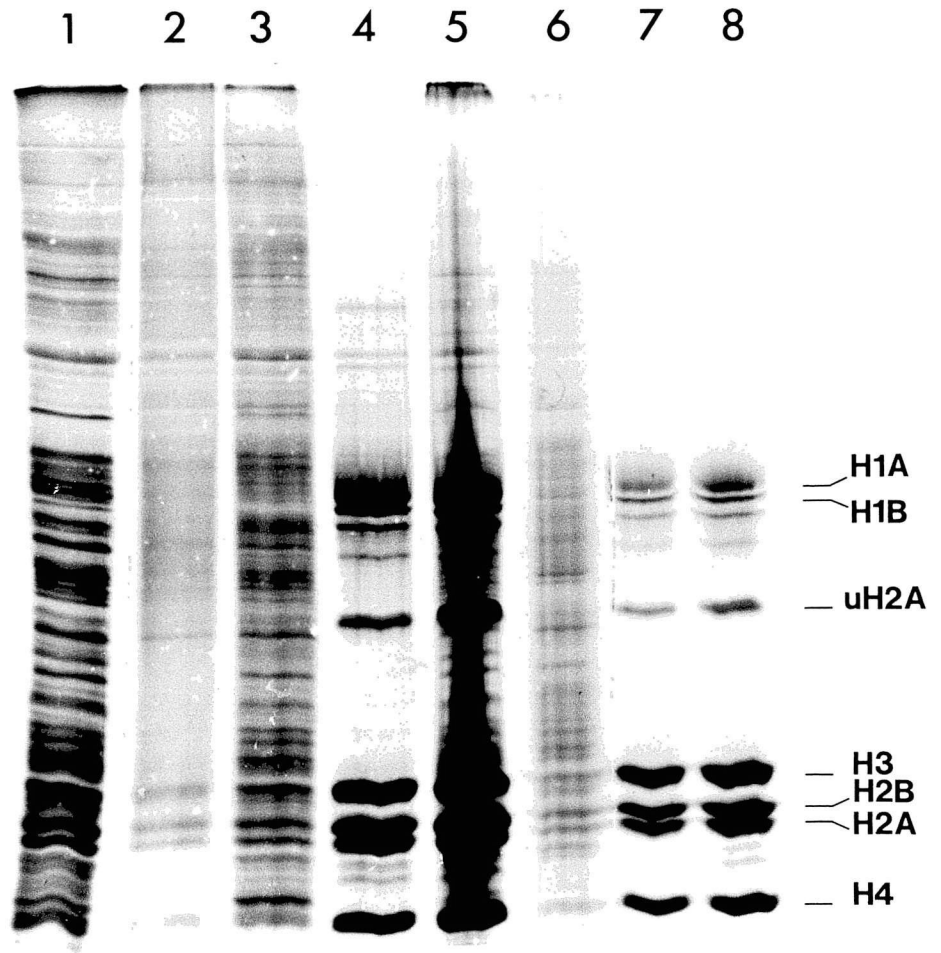
Afin de déterminer la fraction de la chromatine qui se prête le mieux aux expériences ultérieures, une analyse électrophorétique des protéines contenues dans chacune d'elles a été effectuée. Ceci a tout d'abord été fait en effectuant une migration des protéines contenues dans chacune des fractions (figure 11) et ensuite en vérifiant la présence de ces protéines par la réaction de poly(ADP-ribosylation) (figures 12 et 13).

Dans la fraction DS (puits # 3, figure 11), une grande quantité de protéines est observée. Il est évident que la plupart de ces protéines correspondent à des protéines chromosomales non histones. Afin de vérifier la présence des protéines histones, éléments essentiels de ce projet, une précipitation des histones du coeur nucléosomal à l'acide sulfurique a alors été effectuée à partir de cette fraction. Les résultats montrent (puits # 2) que la fraction DS contient les histones H2A, H2B, H3 et H4. Quoique leur présence paraisse être assez certaine (puits # 1 et 3), il est difficile d'affirmer la présence des protéines HMG 1 et 2 dû au trop grand nombre de bandes qui y sont retrouvées. Notons que cette fraction ne contient pas d'histones H1.

Figure 11

Analyse électrophorétique des protéines retrouvées dans chacune des fractions DS, NCh et NSh de la chromatine.

Le gel présente d'abord la précipitation de la fraction DS à l'acide sulfurique effectuée suivant les étapes décrites à la section 2.2.2.3. Le puit # 1 contient le surnageant obtenu lors de cette réaction tandis que le culot est retrouvé dans le puit # 2. La fraction DS totale est représentée dans le puit # 3. Les fractions totales NCh et NSh sont montrées dans les puits # 4 et 5 respectivement tandis que les puits # 6, 7 et 8 représentent les fractions DS, NCh et NSh purifiées au préalable dans un gel d'agarose 1%, 0,01 X TBE. L'électrophorèse a été effectuée suivant la technique de Laemmli (section 2.2.6.1) en utilisant 22 % d'acrylamide et un gel de 0,75 mm d'épaisseur. Les protéines ont été colorées au nitrate d'argent.



En analysant le contenu en protéines des fractions NCh (puits # 4) et NSh (puits # 5), on remarque qu'elles contiennent sensiblement les mêmes éléments. Les histones H1A, H1B, H2A, H2B, H3 et H4 y sont facilement détectables. On peut aussi suggérer la présence des protéines HMG 1 et 2. Afin de mieux déterminer la présence des histones associées avec l'ADN dans les oligonucléosomes détectés par le bromure d'éthidium dans les gels d'agarose, nous avons fait l'analyse suivante. Les régions mononucléosomales (pour la fraction DS) et polynucléosomales contenant des chaînes de taille de 2 à 10 nucléosomes (pour les fractions NCh et NSh) ont été découpées d'un gel d'agarose natif et les protéines ont été extraites et analysées sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les résultats (puits 6, 7 et 8 de la figure 11) montrent la présence des histones du coeur nucléosomal (DS, NCh et NSh) et de l'histone H1 (NCh et NSh). Dans le cas des puits #7 et 8, la présence des protéines histones est encore plus facile à visualiser car les échantillons ont été purifiés au préalable par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.2.3 - Analyse électrophorétique des protéines ADP-ribosylées.

La figure 12 présente les gels obtenus en seconde dimension (acide-urée-Triton/ SDS) pour chacune des fractions. Une nouvelle fraction nommée "noyaux digérés" a été ajoutée et correspond aux fractions NCh et NSh non séparées. Notons que ces gels contiennent, de plus, des protéines poly(ADP-ribosylées) qui ne sont détectables que

Figure 12

Electrophorèse en seconde dimension, sur gel de polyacrylamide (22%) en présence de SDS, des différentes fractions de la chromatine après avoir effectué la réaction de poly(ADP-ribosylation).

Le gel A présente la fraction noyaux digérés, le gel B, la fraction DS, le gel C, la fraction NCh et la fraction NSh est représentée sur le gel D. Chacun des gels possède une épaisseur de 1 mm et est coloré au bleu de Coomassie. La migration en première dimension a été effectuée sur un gel AUT d'une épaisseur de 0,75 mm.

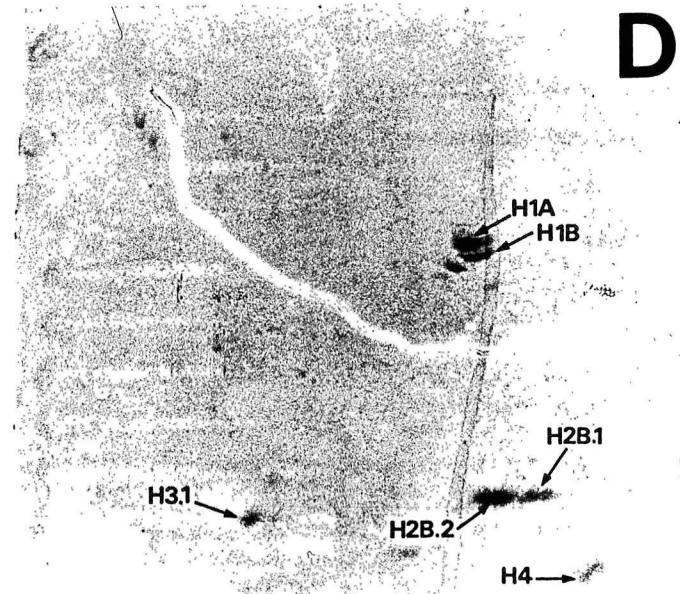
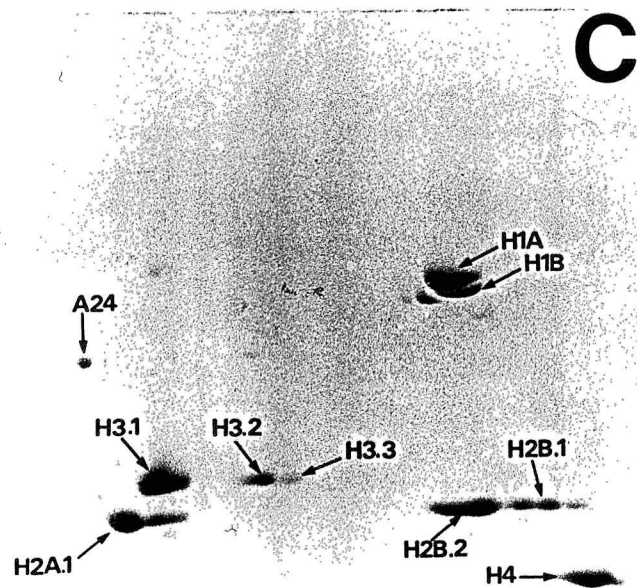
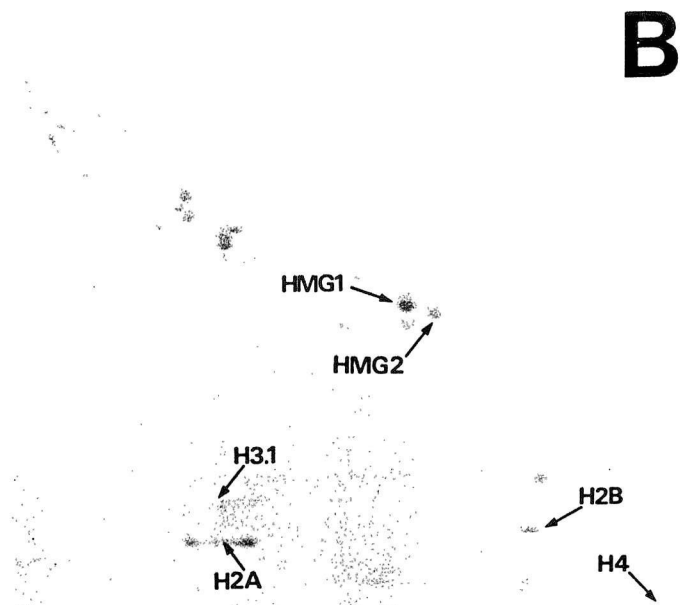
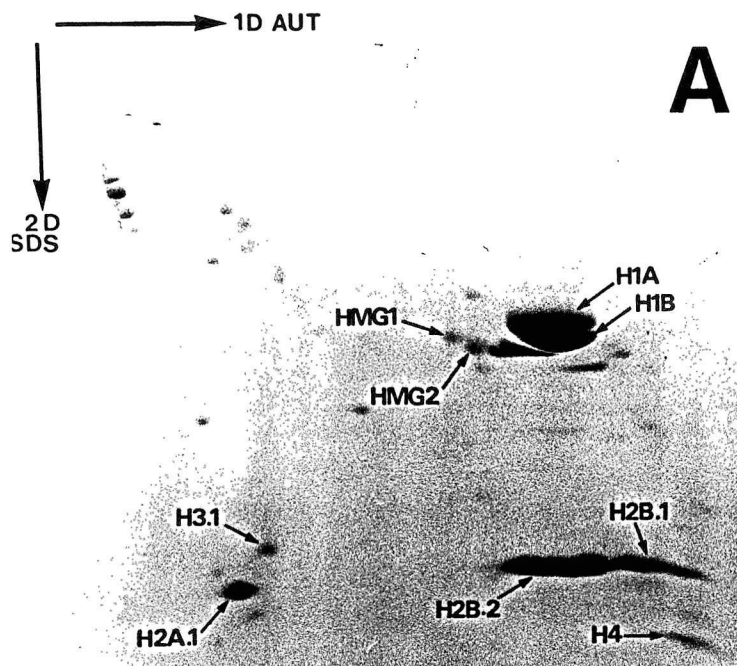
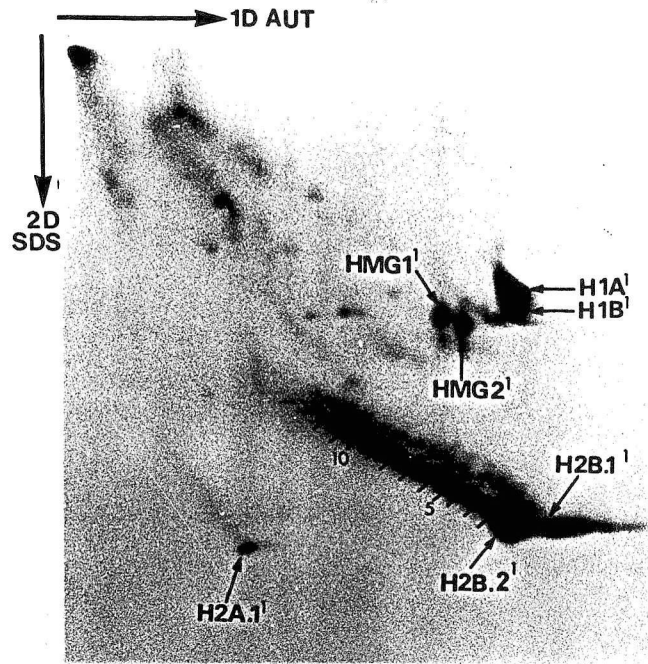


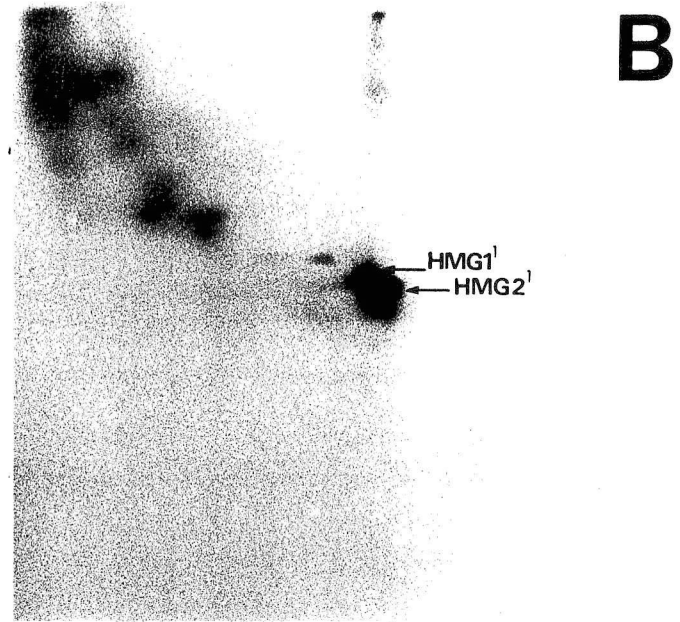
Figure 13

Autoradiogrammes des gels de la migration en seconde dimension des échantillons poly(ADP-ribosylés) pour chacune des fractions de la chromatine.

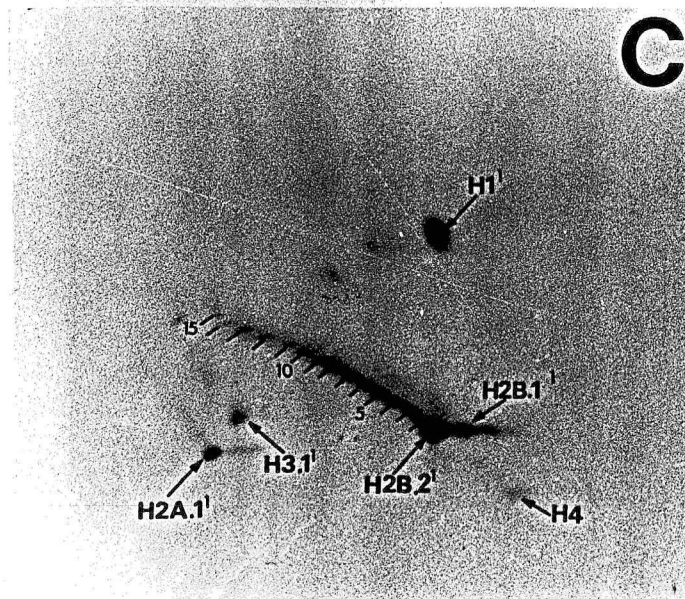
Les lettres A, B, C et D correspondent aux gels A, B, C et D de la figure 4. Les chiffres 1, 2, 3 ... indiquent les formes mono, di, tri ... ADP-ribosylées des protéines chromosomales. L'exposition a été effectuée durant 3 jours à -80°C.



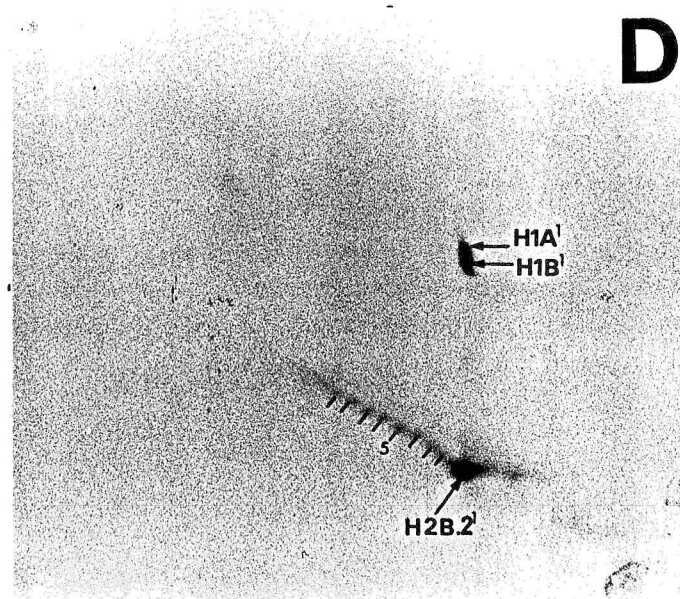
A



B



C



D

par autoradiographie (figure 13) dû à leur faible quantité. Dans ces gels, la présence de plusieurs histones variantes (H2B.1, H2B.2, H3.1, H3.2, H3.3) est aussi détectable, la seconde dimension permettant de mieux les visualiser.

Dans la fraction DS (gel B), la présence des protéines HMG 1 et 2 est ici très évidente ainsi que l'absence des histones H1. Ceci correspond bien avec la l'hypothèse que les nucléosomes enrichis en protéines HMG 1 et 2 ne contiennent pas d'histones H1, histones retrouvées dans la chromatine condensée non active (Cary et al., 1984). On peut remarquer la présence d'histones du coeur nucléosomal à l'état de trace ainsi que des variantes de celles-ci. Sur l'autoradiogramme de ce gel (figure 13, gel B), la présence des protéines HMG 1 et 2 mono(ADP-ribosylées) dans cette fraction est d'autant plus évidente. Cependant, on ne remarque pas d'histones du coeur nucléosomal ADP-ribosylées.

Dans les fractions NCh et NSh (figure 12, gels C et D), les histones H1 sont retrouvées en abondance. Les histones du coeur nucléosomal y sont aussi représentées. Dans la fraction NCh, on retrouve une petite quantité des protéines HMG 1 et 2 (gels non montrés) pourtant non évidente sur le gel montré ici. Une fois mono(ADP-ribosylées), les protéines HMG 1 et 2 sont plus facilement détectables par autoradiographie (figure 13). Dans ces fractions (NCh et NSh), c'est surtout l'histone H2B.1 qui se retrouve sous forme poly(ADP-ribosylée).

Sur le gel de la fraction "noyaux digérés" (figure 12, gel A), on peut observer la présence des protéines HMG 1 et 2, des histones du coeur nucléosomal et des histones H1. Sur l'autoradiogramme, on détecte aussi certaines de ces protéines (figure 13, gel A). Les protéines HMG sont ici aussi représentées sous forme mono ADP-ribosylée. Il en est de même pour les histones H1. L'histone H2B.1 est encore la protéine la plus poly(ADP-ribosylée). Notons enfin que les quantités de chacune des protéines ne peuvent être comparées d'un gel à l'autre car ce ne sont pas les mêmes quantités de matériel qui ont été appliquées sur chacun de ces gels. De plus, l'identité du mono(ADP-ribose) ou du poly(ADP-ribose) n'est pas discutée sur les gels. Plusieurs laboratoires ont des données précises à l'effet que, par électrophorèse sur gel, on observe quinze bandes alors que l'on sait qu'il y a des polymères qui contiennent jusqu'à 55 unités attachées à l'histone H1 (Hultesky et al., 1989). Pour finir, il est bon d'ajouter les remarques suivantes sur la réaction de poly(ADP-ribosylation) effectuée dans ce travail. Afin d'établir le fait qu'une protéine est poly(ADP-ribosylée), on doit démontrer, par chromatographie sur boronate (qui est spécifique pour les groupements cis-diol) précédée par un traitement à la base, qu'il y a du poly(ADP-ribose). Celui-ci peut alors être identifié par digestion à la phosphodiesterase qui génère du PRAMP + AMP. Ceci n'a pas été fait ainsi que la détermination de la valeur de l'activité spécifique de la poly(ADP-ribose) polymérase associée aux nucléosomes et aux noyaux. La stabilité de l'enzyme à la congélation n'est pas discutée aussi.

3.3 - Réactions de réticulation.

3.3.1 - Apparition d'une bande nommée " ϕ " dans la fraction DS réticulée.

Comme le gel coloré à l'argent de la figure 11 montre la présence des histones du coeur nucléosomal dans la fraction DS et que les autoradiogrammes (figure 13) montrent la présence des protéines HMG 1 et 2 dans cette même fraction, la réaction de réticulation a donc été effectuée dans la fraction DS. Notons que la fraction DS doit contenir les mononucléosomes enrichis en protéines HMG 1 et 2 (voir introduction). La figure 14 présente les résultats obtenus.

Le gel A montre le profil de migration électrophorétique de l'échantillon témoin. Les protéines HMG 1 et 2 et les histones du coeur nucléosomal sont présentes tandis que les histones H1 sont absentes. Lors de l'ajout de l'agent réticulant (gelB), la disparition des protéines HMG 1 et 2 est alors notée et une nouvelle bande de plus haute masse moléculaire désignée " ϕ " apparaît. Cette dernière est située dans la région des systèmes à double composantes et pourrait donc représenter un système formé de la protéines HMG 1 ou 2 et d'une des histones du coeur nucléosomal. La bande ϕ pourrait donc être le résultat d'une association covalente de la protéine HMG 1(2) avec une protéine de contact. Notons enfin que l'on retrouve une certaine quantité d'histones libérées après réticulation suggérant ainsi que la réaction réalisée dans ces conditions n'est pas complète.

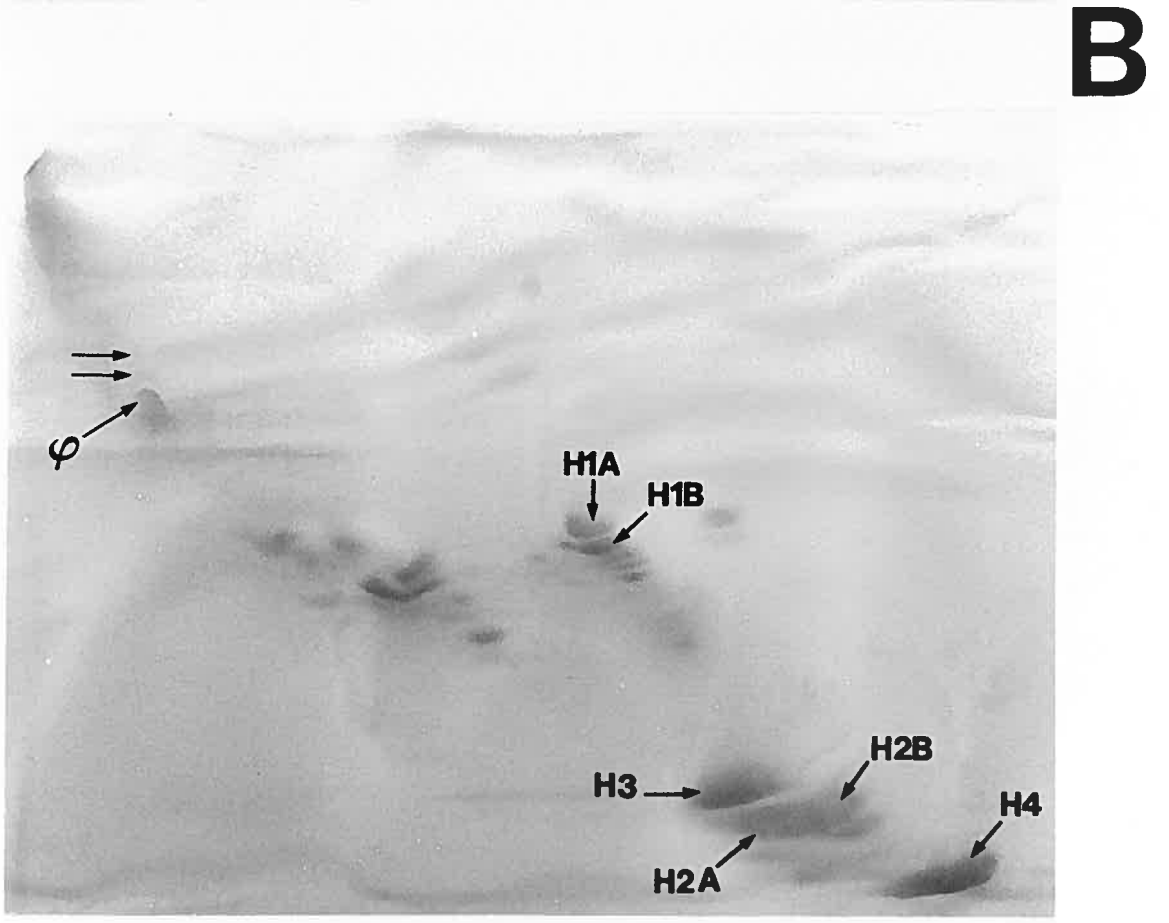
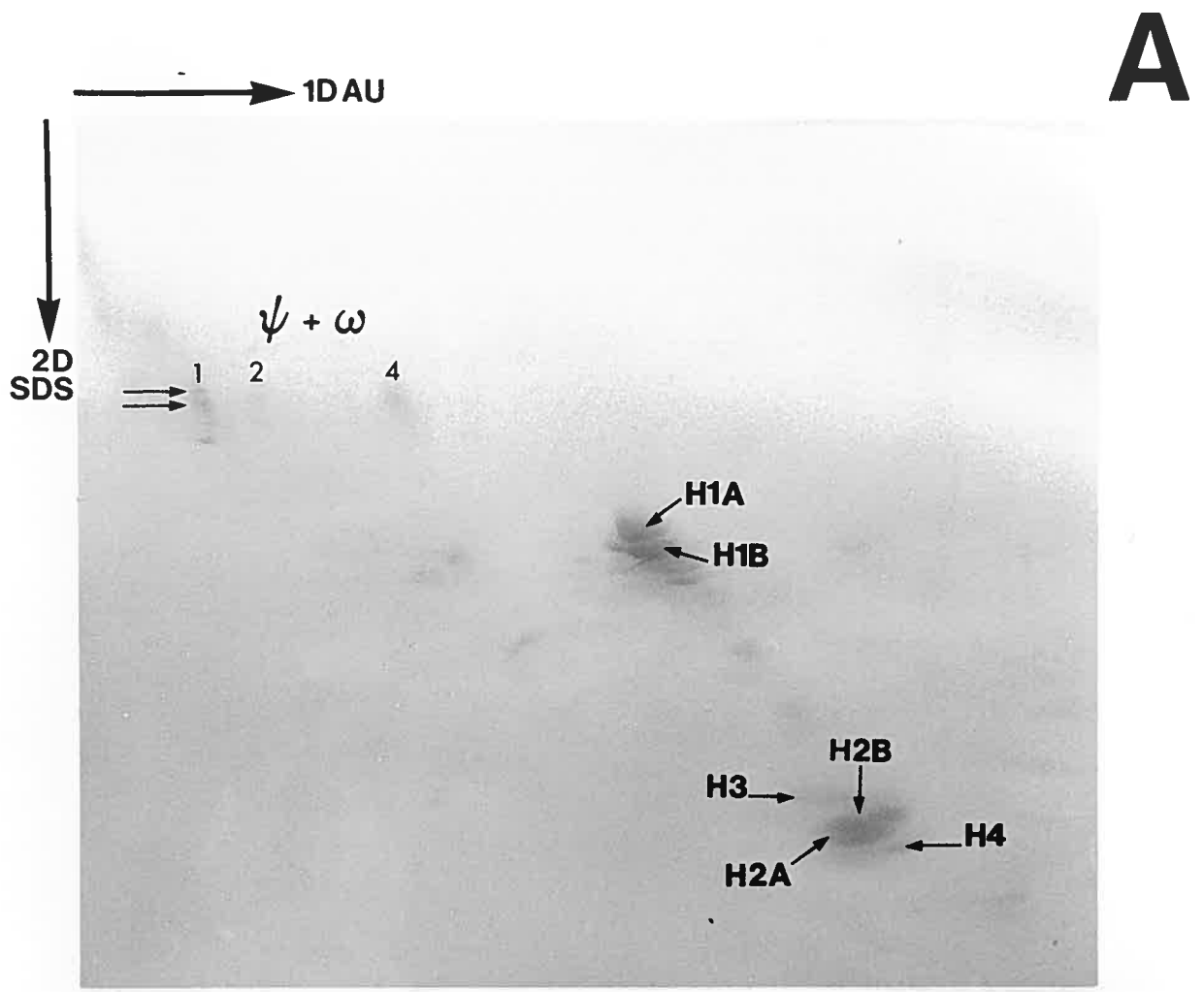
Figure 14

Electrophorèse en seconde dimension sur gel de polyacrylamide (19%) de la fraction DS avant et après réaction de réticulation en présence d'EDAC.

Les échantillons ont été préparés suivant les étapes décrites à la section 2.2.3.1. L'électrophorèse a été effectuée selon la méthode de Laemmli en utilisant 19% d'acrylamide et des gels de 1 mm d'épaisseur. La coloration est effectuée au bleu de Coomassie. La migration en première dimension a été faite sur un gel AU de 0,75 mm d'épaisseur.

A: Fraction DS non réticulée (témoin)

B: Fraction DS réticulée



3.3.1.1 - Présence probable d'une liaison électrostatique HMG - nucléosome dans la fraction DS

Il faut cependant vérifier si les protéines HMG 1 et 2 retrouvées dans la fraction DS ne sont pas simplement des molécules libres en solution. Il faut s'assurer de la présence d'une liaison entre les protéines HMG 1 et 2 et les nucléosomes dans cette fraction, s'assurer que ces deux éléments sont en contact électrostatique.

Les gels A et B de la figure 15 montrent les mêmes échantillons. Cependant dans le gel A, la visualisation de la séparation des chaînes de nucléosomes est meilleure tandis que dans le gel B, il est plus facile, le gel une fois broyé, d'y extraire les protéines. Un morceau de gel B qui correspond aux régions mononucléosomale (pour la fraction DS) et polynucléosomale (chaînes d'une longueur de 2 à 10 nucléosomes) pour les fractions NCh et NSH est alors coupé. Le gel C montre les protéines qui ont migré avec l'ADN. Dans la fraction NCh (puit # 2, gel C) les histones du coeur nucléosomal, les histones H1 et un peu de protéines HMG 1 et 2 sont évidentes. Dans la fraction DS (puit # 1), la présence des histones du coeur nucléosomal est évidente mais ce n'est pas le cas pour les protéines HMG 1 et 2. Ces dernières retrouvées dans la fraction DS lors de l'expérience de poly(ADP-ribosylation) seraient donc, pour la majorité, des protéines relâchées à l'état libre lors de la digestion à la nucléase micrococcale. Le puits # 3 (gel C) montre une fois de plus la fraction DS non purifiée. En comparant cette fraction avec

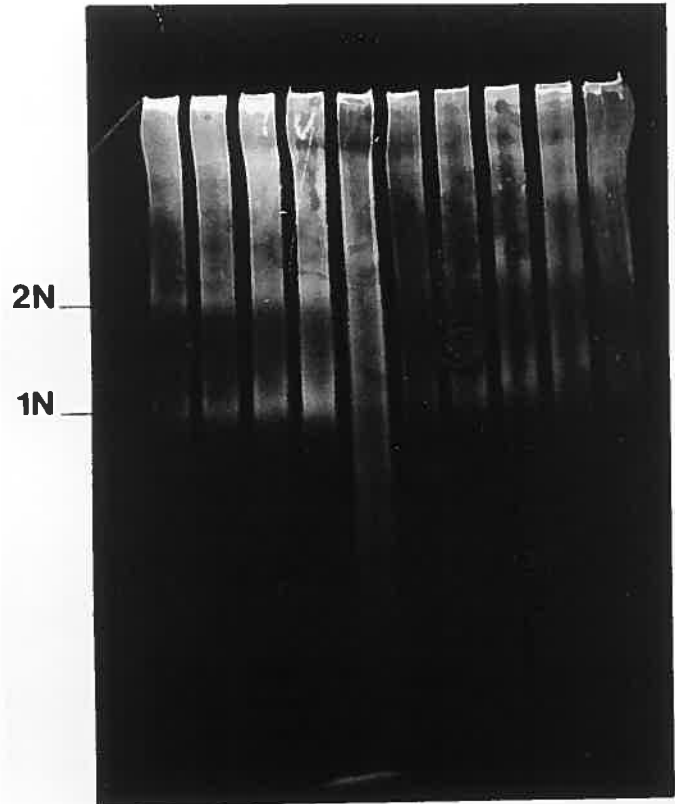
Figure 15

Vérification de la présence d'une liaison électrostatique protéine HMG-nucléosome dans la fraction DS.

Le gel natif A possède 1,5 mm d'épaisseur et contient à la fois 3,5% (P/V) d'acrylamide et 0,5% (P/V) d'agarose. Le gel B contient de l'agarose seulement à une concentration de 1% (P/V) et 0,01 X TBE. Ces deux gels sont colorés au bromure d'éthidium et contiennent les trois fractions de la chromatine selon l'ordre suivant. Le gel A contient, dans les puits # 1 à 4, la fraction NCh (puits # 1 à 5 pour le gel B), la fraction NSH, dans les puits # 6 à 10 (puits # 7 à 11 pour le gel B) et la fraction DS qui se retrouve dans le puits # 5 (puits # 6, gel B). Les puits # 1 et 2 du gel C représentent respectivement les fractions DS et NCh purifiées sur gel d'agarose (gel B). Le puit # 3 (gel C) présente la fraction DS non purifiée. L'électrophorèse de ces derniers échantillons a été effectuée suivant la technique de Laemmli en utilisant 22% d'acrylamide et un gel de 0,75 mm d'épaisseur. Les protéines ont été colorées au nitrate d'argent.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

A



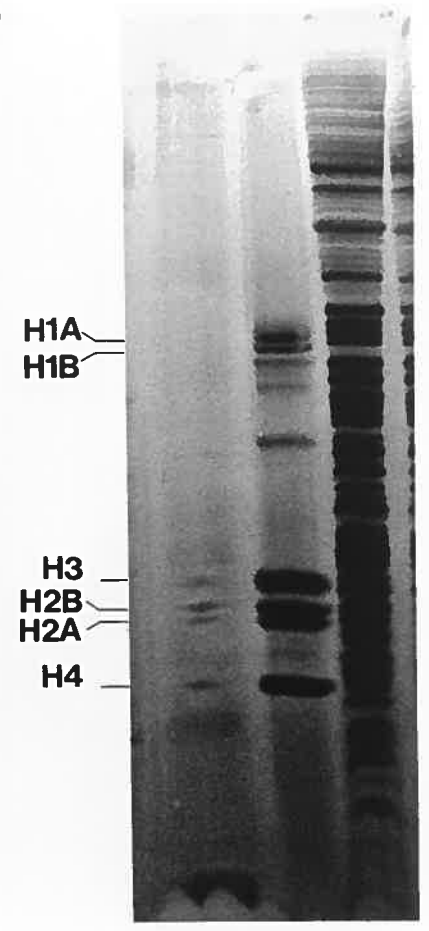
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

B



1 2 3

C



celle purifiée (puits # 1), il est facile aussi de déduire que la plupart des protéines retrouvées dans la fraction DS sont en majorité des protéines non histones.

3.3.2 - Mise en évidence de la bande ϕ après réticulation dans la fraction "noyaux digérés".

Comme les protéines HMG 1 et 2 ne semblent pas être en interaction électrostatique avec les nucléosomes dans la fraction DS, on a alors décidé d'utiliser la fraction "noyaux digérés" qui contient à la fois les histones du coeur nucléosomal, les histones H1 et les protéines HMG 1 et 2 (résultats de la réaction de poly(ADP-ribosylation). De plus, le travail avec cette fraction s'avère plus facile, la quantité de protéines y étant beaucoup plus grande.

Le gel A de la figure 16 présente le profil de migration électrophorétique de l'échantillon servant de témoin. On y retrouve les histones H1, les histones du coeur nucléosomal et les protéines HMG 1 et 2. Lors de l'ajout de l'agent réticulant (gel B), l'apparition d'une série de nouvelles bandes est alors obtenue. On y retrouve entre autres une zone distincte (zone encadrée) appelée ici zone des systèmes à deux composantes et qui est formée de bandes contenant les histones du coeur nucléosomal seulement. Ces bandes ont été identifiées auparavant (Boulikas, 1988b; figure 17).

Figure 16

Electrophorèse en seconde dimension sur gel de polyacrylamide (19%) de la fraction "noyaux digérés" avant et après la réaction de réticulation en présence d'EDAC.

Les échantillons ont été préparés suivant les étapes décrites à la section 2.2.3.2. L'électrophorèse a été effectuée selon la méthode de Laemmli en utilisant 19% d'acrylamide et des gels de 1 mm d'épaisseur. Les protéines sont colorées au bleu de Coomassie. Un gel AU de 0,75 mm d'épaisseur a été utilisé pour la migration en première dimension.

A: Fraction "noyaux digérés" non réticulée (témoin)

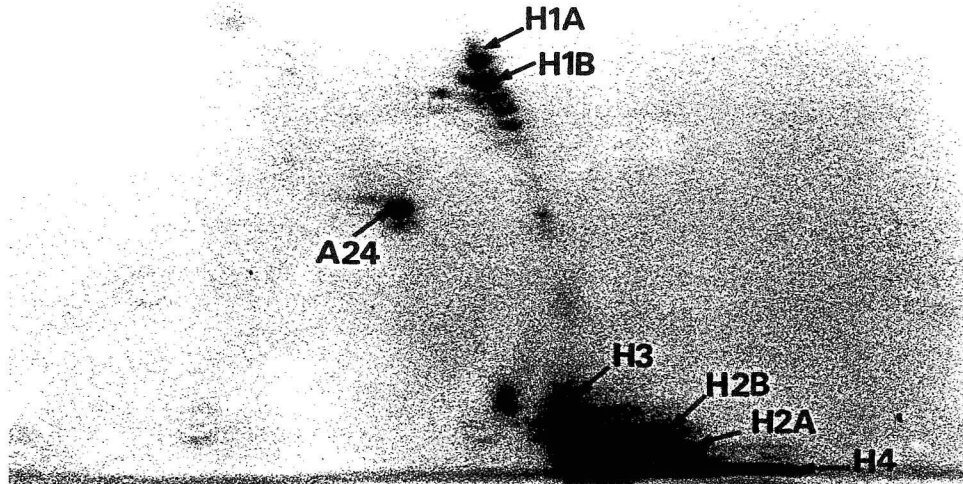
B: Fraction "noyaux digérés" réticulée

Zone encadrée: systèmes à deux composantes

formés des histones du coeur nucléosomal

1D AU
2D SDS

A



B

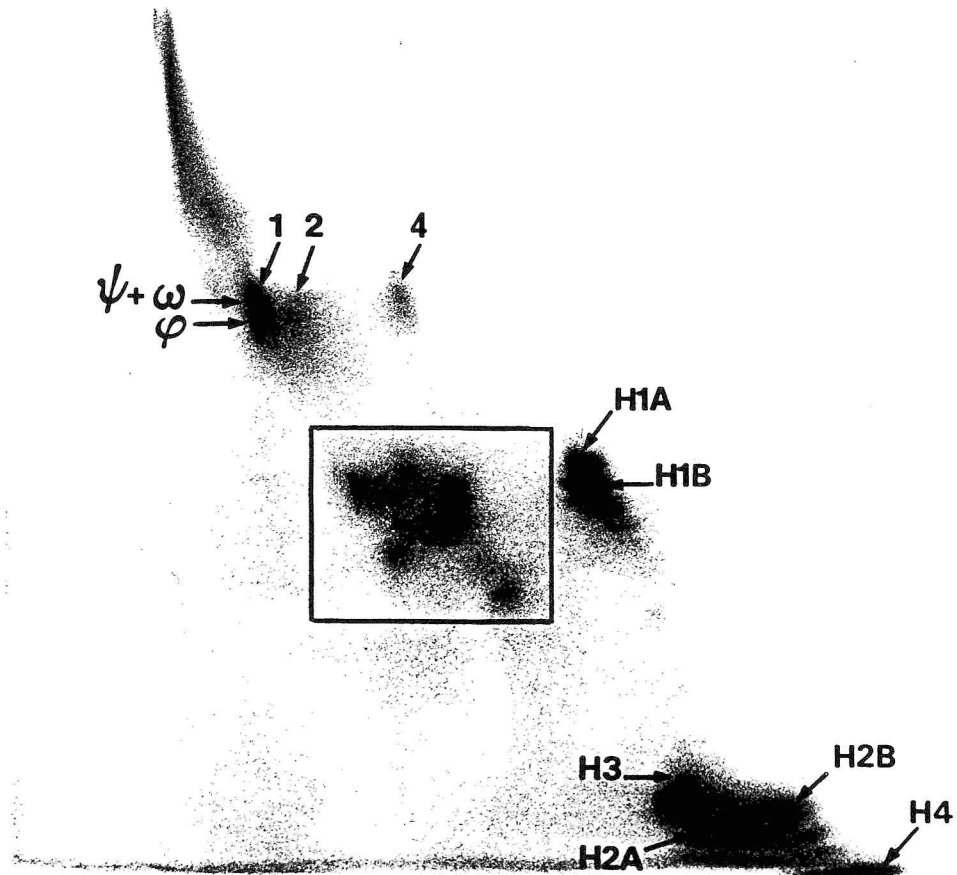
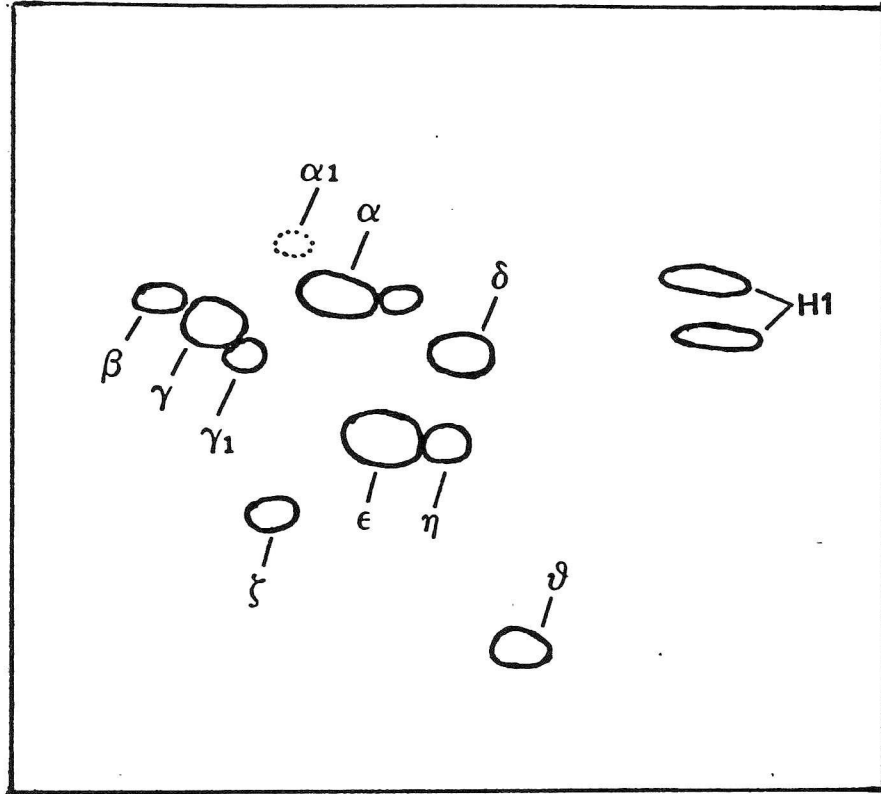


Figure 17

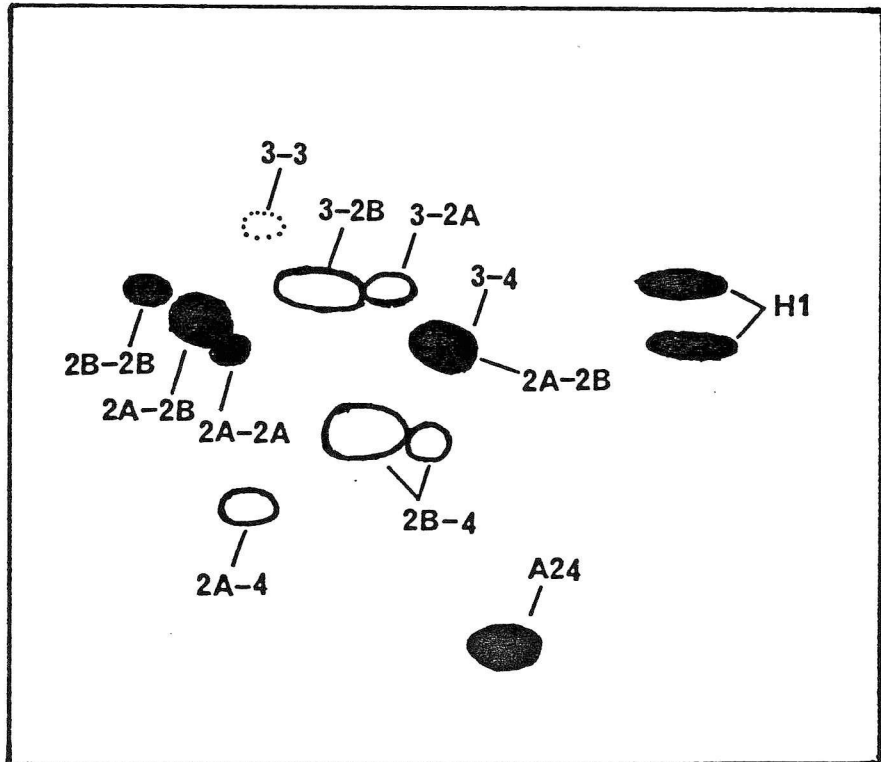
Schéma de l'identification des systèmes à deux composantes formés d'histones de coeur nucléosomal proposé par Boulikas (1988).

La figure A montre la représentation schématique des systèmes à deux composantes, formés d'histones du coeur nucléosomal, produits après réaction de réticulation en présence de carbodiimide. Ces systèmes sont obtenus à partir de la chromatine entière. La figure B identifie les histones formant ces systèmes.

A



B



Le gel montre aussi la présence des bandes ψ et ω . Ces dernières identifiées par Boulikas et al. (1980) correspondent à des systèmes à deux composantes formés de l'histone H1 et de l'histone H2A. L'agent de réticulation utilisé pour ces résultats était l'EDAC. Enfin on retrouve ici aussi la bande ϕ qui, par son emplacement par rapport aux autres bandes, pourrait être un système à deux composantes formé de la protéine HMG 1-2 et d'une des histones du coeur nucléosomal. Notons à ce sujet que la bande ϕ est située au même endroit que celle obtenue à partir de la fraction DS.

3.3.2.1 - Spécificité de la liaison protéine

HMG-nucléosome dans la fraction

"noyaux digérés".

Afin de vérifier la spécificité de la liaison électrostatique protéine HMG-nucléosome dans ces conditions (figure 16), on a déterminé si les protéines HMG 1-2 restaient liées à la chromatine en augmentant la concentration en sel dans le milieu. Les gels de la figure 18 montrent les protéines qui ont été libérées en fonction de la quantité de chlorure de sodium ajoutée. Les protéines qui restent associées à la chromatine à ce moment, restent dans le fond du tube avec l'ADN et ce culot n'est pas appliqué sur les gels.

Lorsque le milieu ne contient pas de NaCl (gel A), on ne retrouve pas de protéines relâchées dans le surnageant. La chromatine demeure associée au culot avec les autres composants. A une

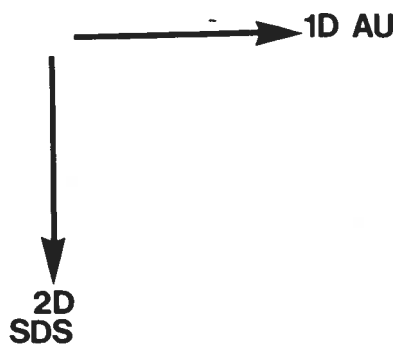
Figure 18

Vérification de la liaison protéine HMG-nucléosome en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium.

Les échantillons ont été préparés suivant les étapes décrites à la section 2.2.3.2.1. Les gels en seconde dimension de 1 mm d'épaisseur possèdent 22% d'acrylamide et sont préparés selon la méthode de Laemmli. Ils sont colorés au bleu de Coomassie. La première dimension a été effectuée sur un gel AU de 0,75 mm. Chacun des gels représentent les protéines relachées de la chromatine par les concentrations de NaCl suivantes:

- A. 0 M NaCl
- B. 0,05 M NaCl
- C. 0,14 M NaCl
- D. 0,35 M NaCl
- E. 0,50 M NaCl
- F. 0,60 M NaCl

A



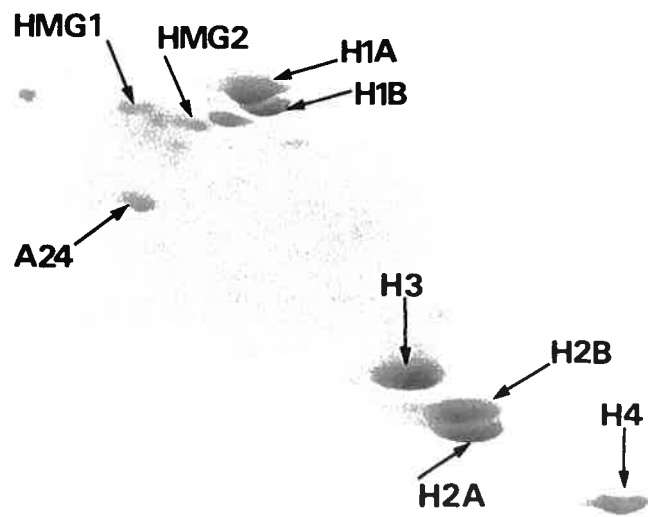
B



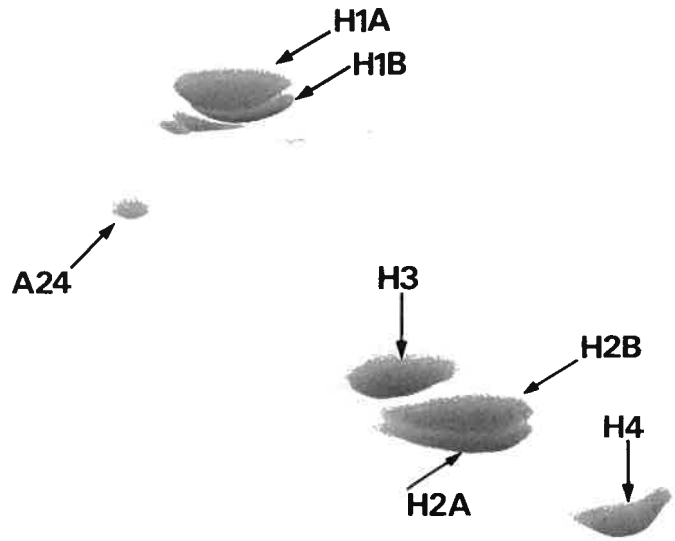
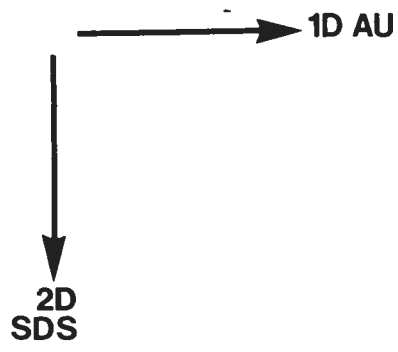
C



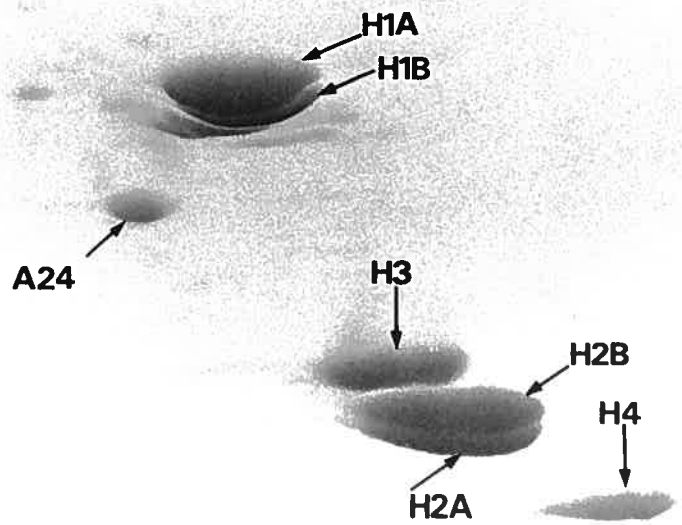
D



E



F



concentration en NaCl de 0,05 M (gel B), seulement quelques protéines chromosomales non histones sont relâchées de la chromatine. A la concentration (0,14 M NaCl), quelques protéines HMG 1 et 2 sont aussi relâchées dans le surnageant (gel C). Ces dernières sont donc liées plus ou moins spécifiquement à la chromatine. Cependant en augmentant la concentration de sel à 0,35 M, concentration à laquelle les protéines HMG sont libérées de la chromatine (Weisbrod et Weintraub, 1979), on note encore la présence des protéines HMG 1 et 2 sur le gel (gel D). La présence des histones H1 et des histones du coeur nucléosomal y est aussi observée. Il faut noter que les milieux contenant les différentes concentrations de NaCl contiennent aussi une petite quantité de $MgCl_2$ (section 2.3.3.2.1.). Les concentrations de sel mentionnées dans la figure 18 sont donc un peu plus faibles qu'elles le sont en réalité.

A une concentration de 0,50 M NaCl, beaucoup plus d'histones H1 et d'histones du coeur nucléosomal se retrouvent dans le surnageant. Une petite quantité de protéines HMG 1 et 2 y est aussi observée. Enfin à une concentration de 0,60 M NaCl, les quantités d'histones H1 et d'histones du coeur nucléosomal relâchées de l'ADN sont importantes. La chromatine, ou plutôt l'ADN qui reste alors dans le fond du tube, est translucide et très visqueuse, cette dernière est probablement complètement dénuée de ses composantes protéiques.

En résumé, cette expérience montre qu'une certaine quantité de protéines HMG 1 et 2 est liée spécifiquement à la chromatine.

3.4 - Hydrolyse acide de la bande ϕ et des histones témoins.

La figure 19 montre le gel de la migration des protéines de la bande ϕ (obtenue à partir du gel de la figure 16B) et des témoins après une hydrolyse acide. Pour chacun des témoins, on observe une bande correspondant à la protéine intacte ainsi que d'autres bandes correspondant aux peptides résultant du clivage. Le puits # 6 contient la bande ϕ non clivée.

En examinant attentivement ce gel, on peut observer une correspondance (montrée par des flèches) entre un peptide produit par le clivage de la bande ϕ (puits # 4) et un peptide provenant de l'hydrolyse de l'histone H3. Il en est de même pour deux autres peptides produits par l'hydrolyse de la protéine HMG 1 (2) (puits # 5) et de la bande ϕ (puits # 4). Notons qu'il est difficile de trouver plusieurs peptides de clivage correspondant à ceux produits par l'hydrolyse de la bande ϕ car les protéines non réticulées ne possèdent pas le même patron de clivage que ces mêmes protéines une fois réticulées.

Afin de mieux interpréter les résultats, une analyse densitométrique de chacun des échantillons du gel de la figure 19 a été faite. Le graphique # 1 de la figure 20 montre le profil de densité et la position des peptides obtenus par hydrolyse de l'histone H2A. Le pic # 3 (123,0 mm) correspond à l'histone H2A intacte et les pics # 5 (134,6 mm), 6 (139,5 mm) et 8 (152,6 mm) correspondent aux

Figure 19

Migration électrophorétique des témoins d'histones, des protéines HMG 1-2 et de la bande ϕ après hydrolyse acide.

Chacun des puits montre les peptides de clivage obtenus pour chaque protéine hydrolysée par 30 mM HCl (105°C) durant 3 heures. Les chiffres correspondent aux divers puits.

1. histone H1A
2. histone H1B
3. histone H3
4. bande ϕ
5. protéine HMG 1-2
6. bande ϕ non hydrolysée
7. histone H2A
8. histone H2B
9. histone H4

Le gel Laemmli contient 22% d'acrylamide et a été coloré au nitrate d'argent. Il possède 0,75 mm d'épaisseur.

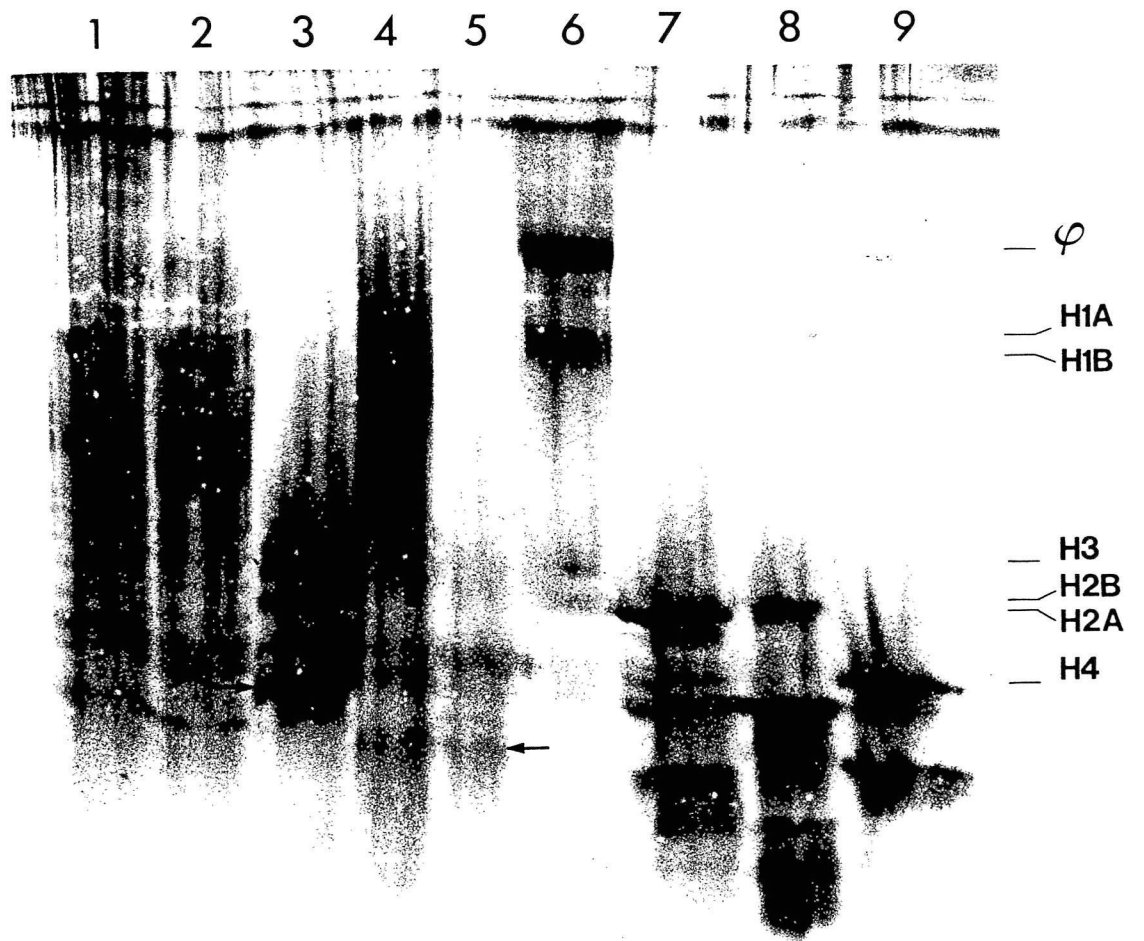
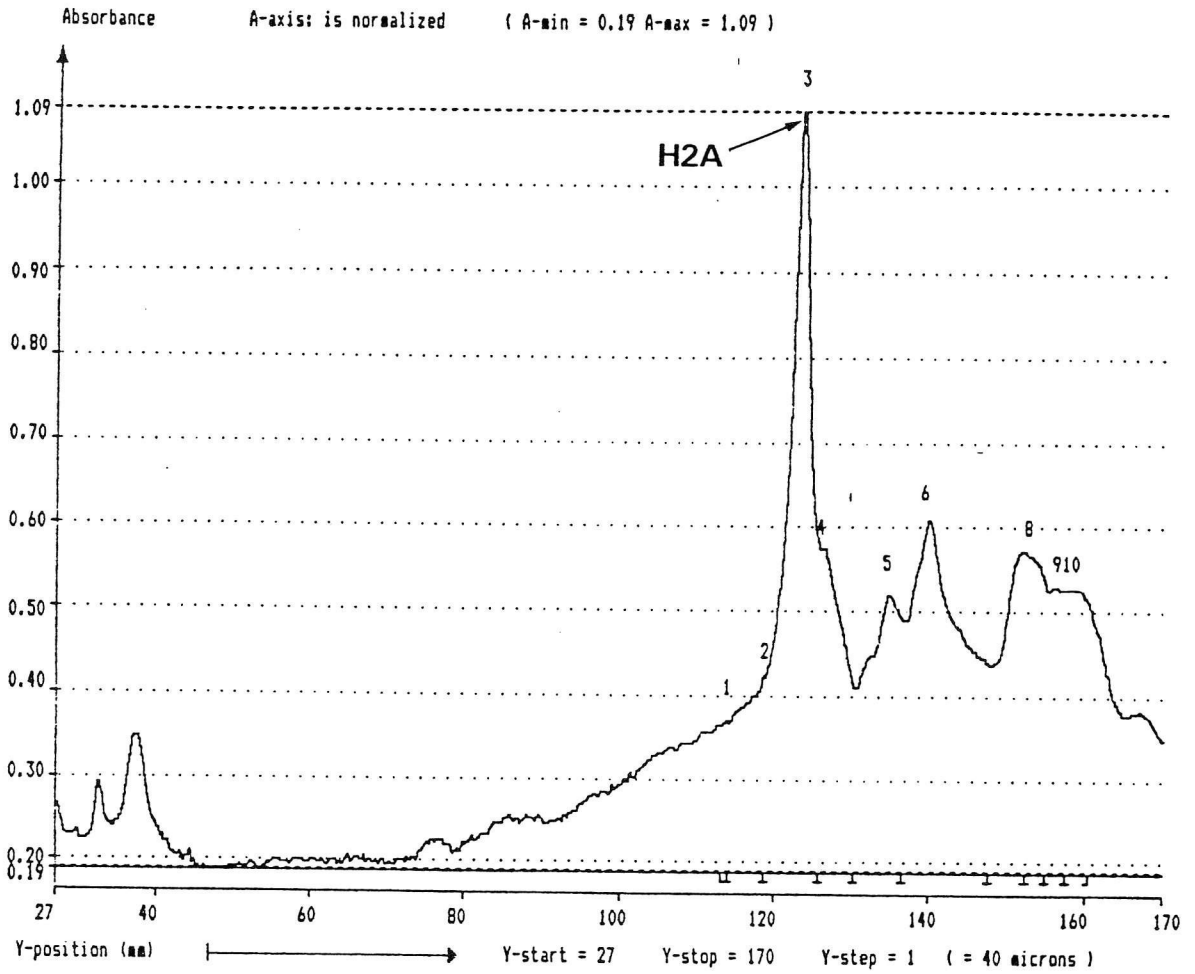


Figure 20

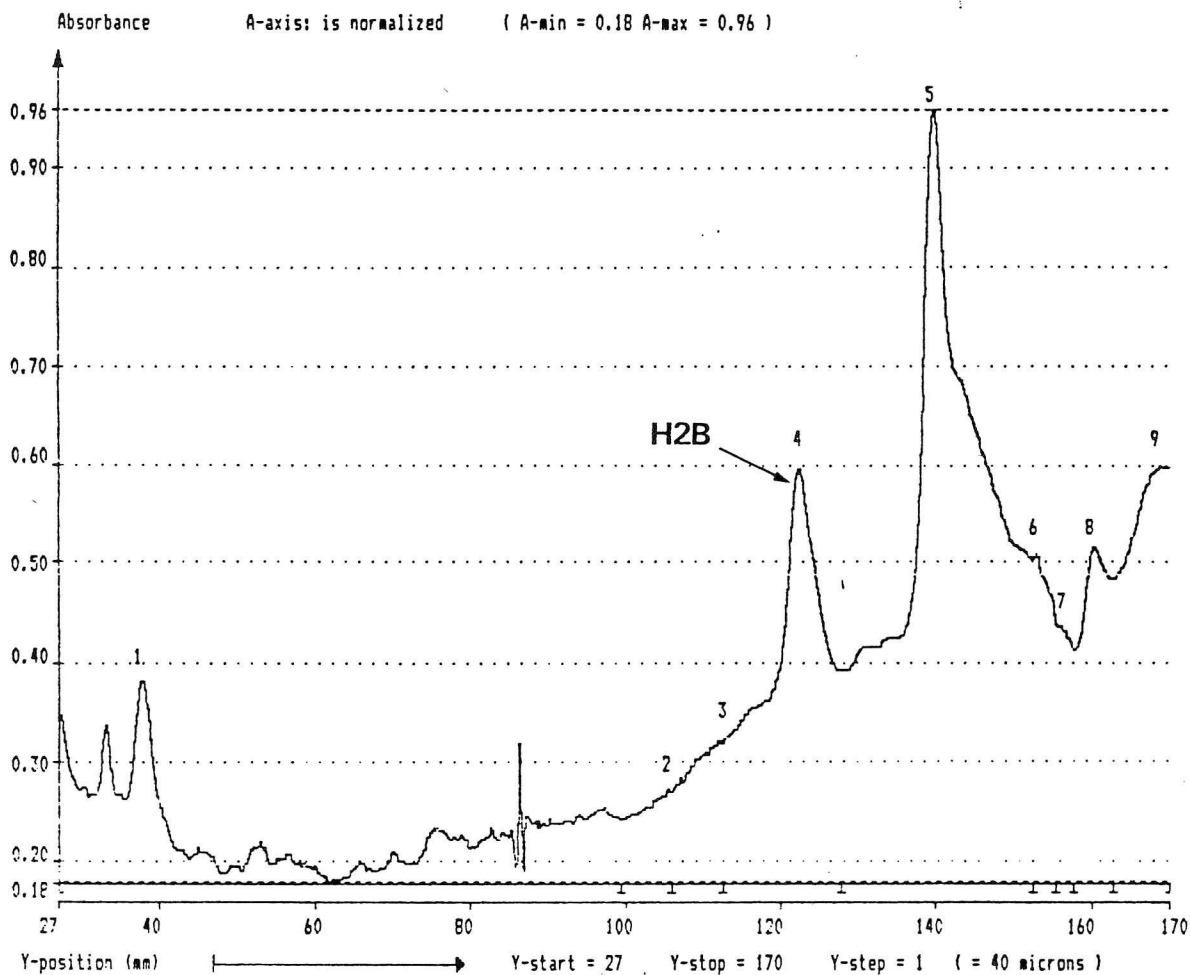
Représentation densitométrique du profil de migration électrophorétique de chacun des échantillons hydrolysés.

L'intensité de coloration (nitrate d'argent) des gels a été déterminée automatiquement. Chaque graphique décrit l'intensité relative et la position des bandes de migration obtenues des protéines et témoins hydrolysés suivants:

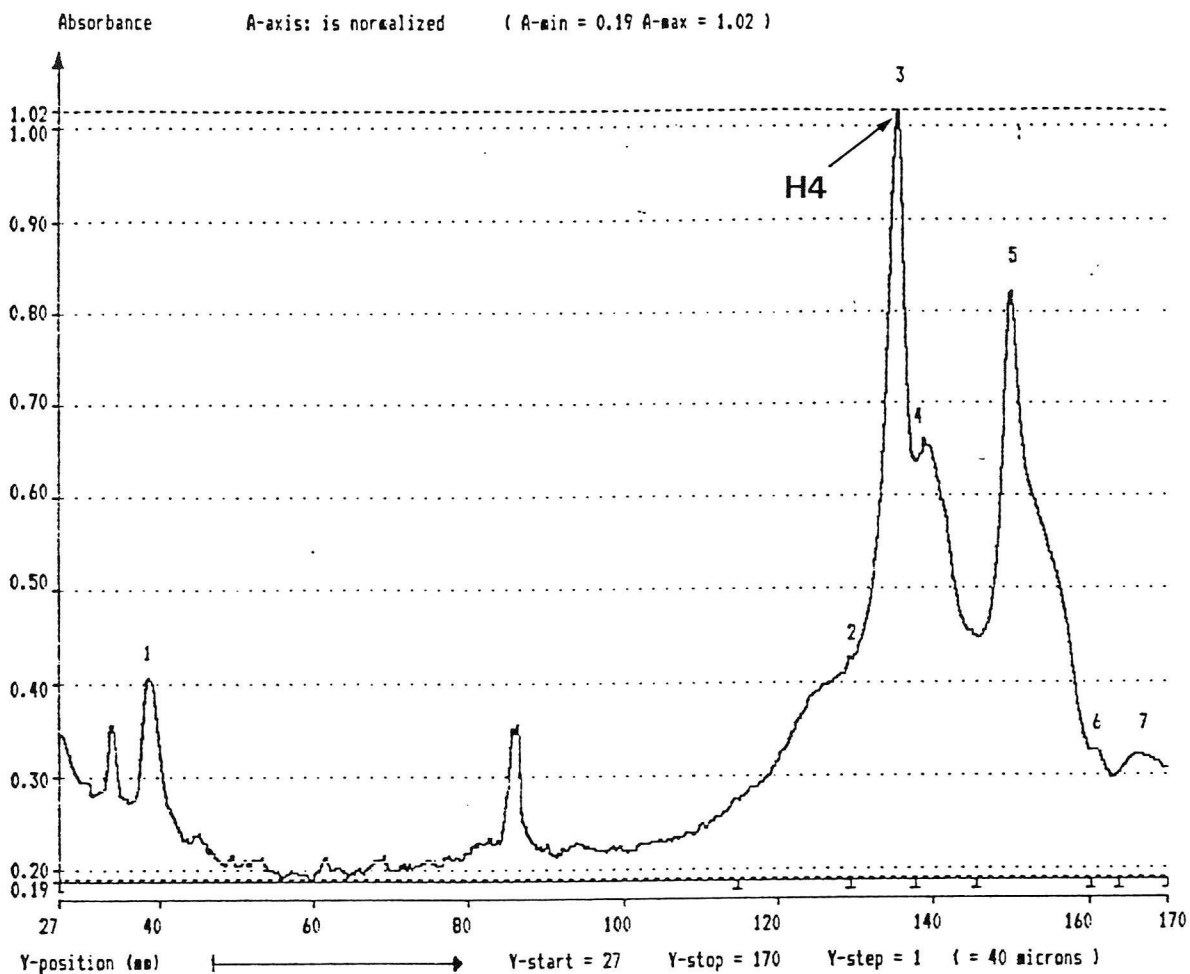
1. histone H2A
2. histone H2B
3. histone H4
4. bande ϕ
5. protéines HMG 1-2
6. histone H3



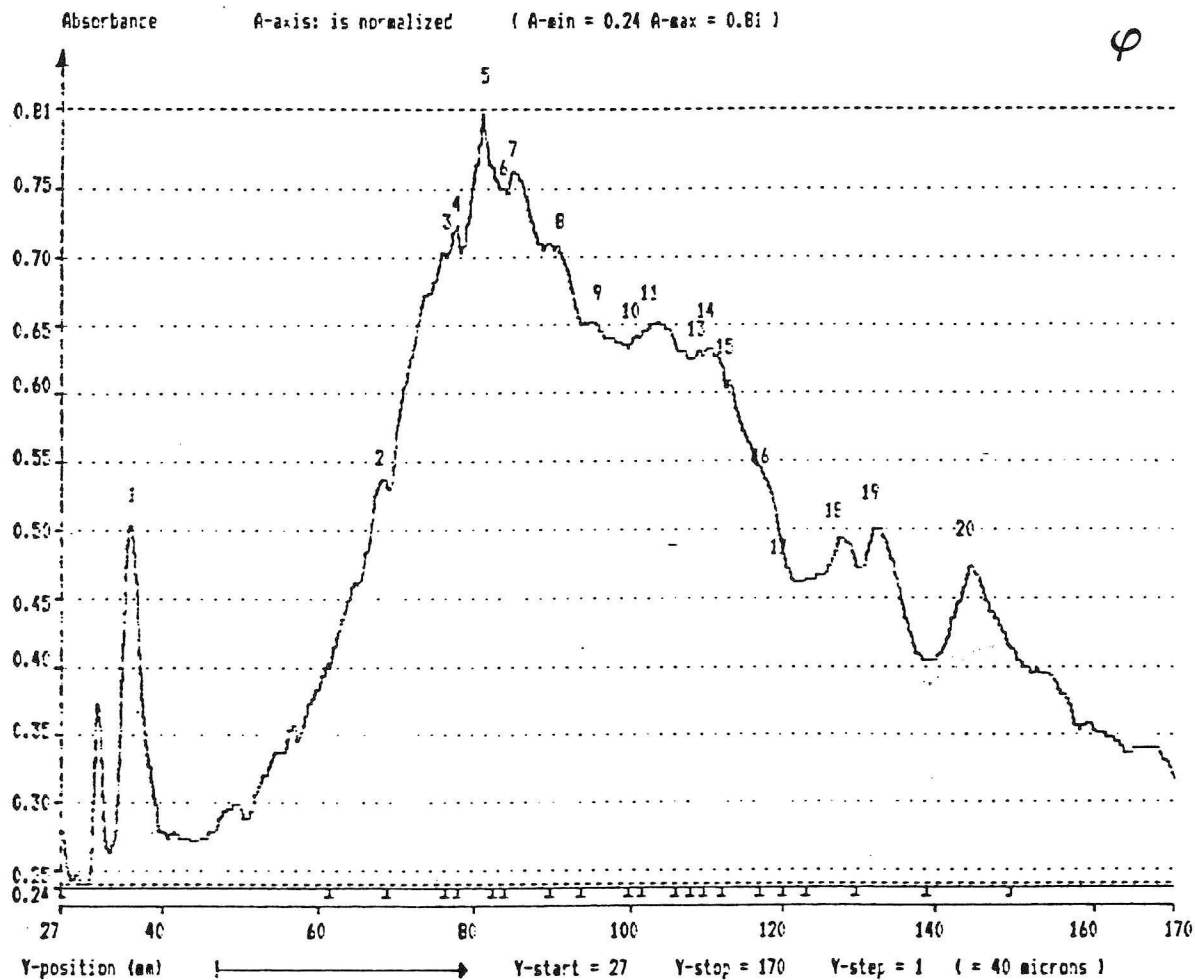
PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %	PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %
1	113.48	0.18	0.167	1.06	6	139.52	0.42	3.525	22.34
2	118.24	0.23	0.966	6.12	7	151.76	0.38	1.550	9.82
3	123.00	0.90	3.619	22.93	8	152.60	0.38	0.963	6.10
4	126.08	0.39	1.361	8.62	9	155.92	0.34	0.894	5.66
5	134.56	0.33	1.764	11.18	10	158.84	0.34	0.971	6.15



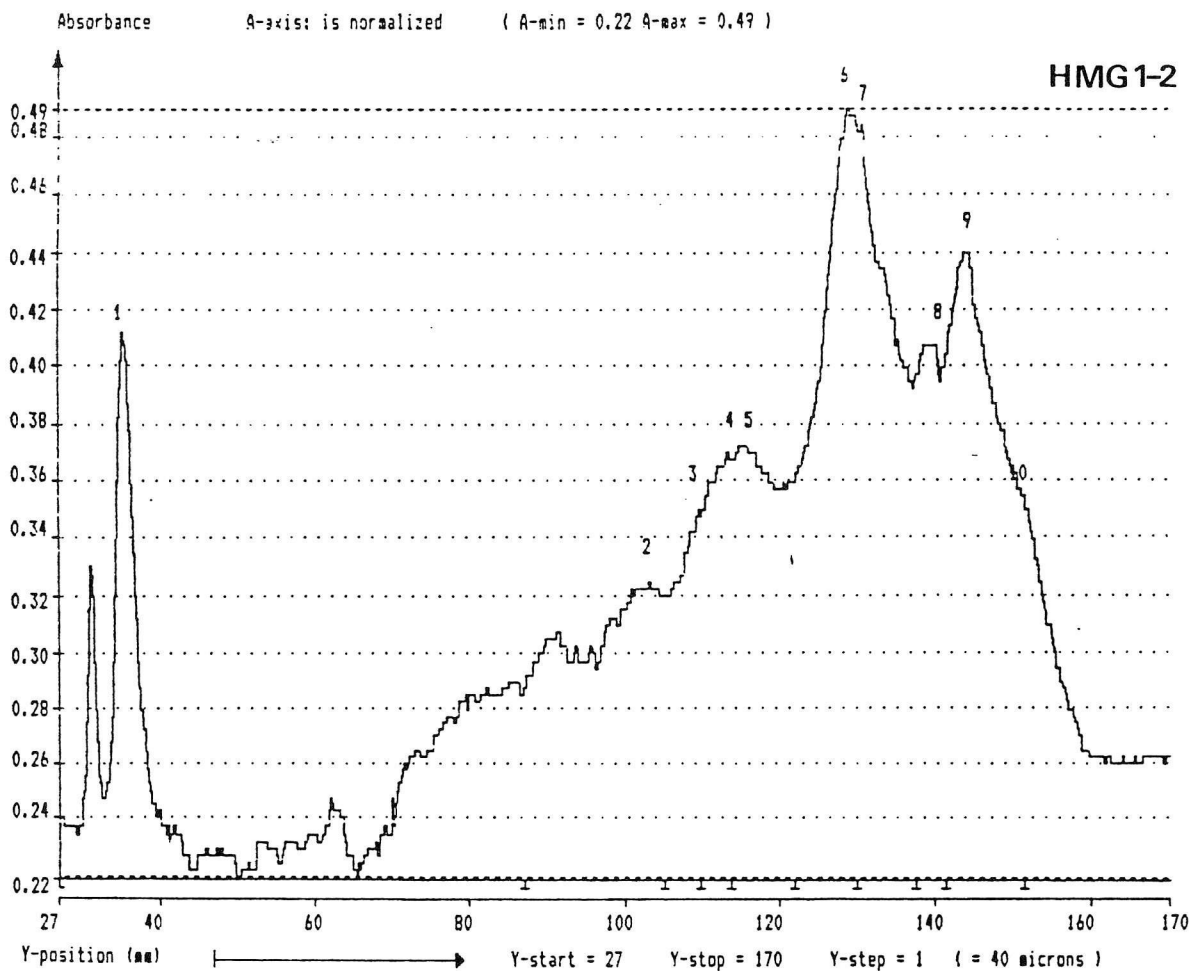
PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %	PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %
1	37.76	0.21	3.741	15.53	6	152.76	0.33	0.927	3.85
2	105.24	0.10	0.511	2.12	7	155.80	0.26	0.576	2.39
3	112.04	0.14	0.817	3.39	8	160.20	0.34	1.593	6.61
4	122.16	0.42	3.718	15.43	9	168.88	0.42	2.723	11.30
5	139.04	0.76	9.491	39.39					



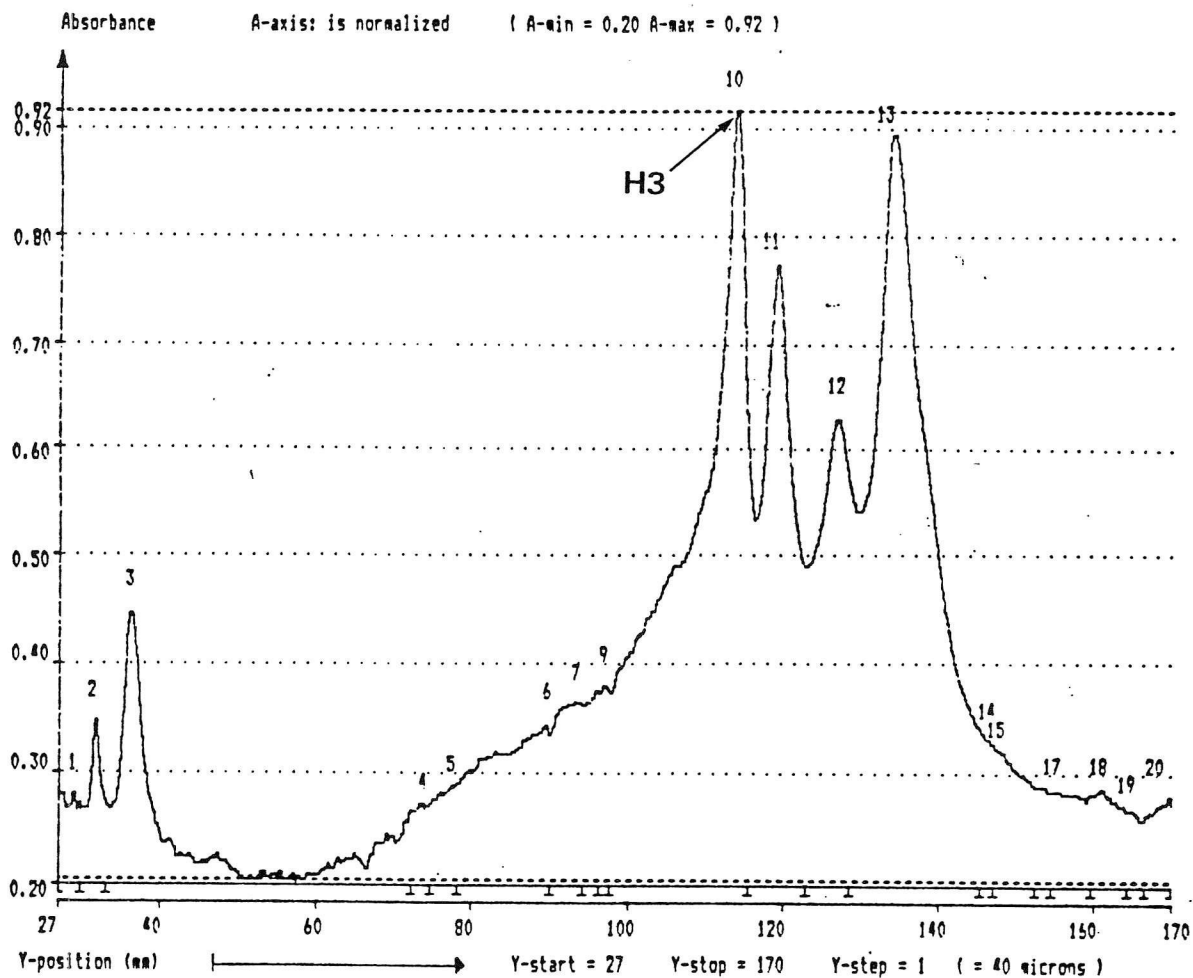
PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %	PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %
1	38.16	0.21	4.090	20.97	5	149.56	0.63	5.115	26.22
2	128.92	0.24	2.329	11.94	6	160.76	0.14	0.445	2.28
3	135.00	0.83	3.882	19.90	7	166.48	0.13	0.790	4.05
4	138.40	0.47	2.856	14.64					



PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %	PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %
1	35.48	0.26	2.635	8.18	11	103.20	0.41	1.753	5.44
2	68.04	0.30	1.791	5.56	12	106.60	0.39	0.760	2.36
3	75.48	0.46	3.052	9.48	13	108.48	0.39	0.683	2.12
4	77.16	0.48	2.739	8.29	14	110.04	0.39	0.986	3.06
5	80.44	0.57	2.389	7.42	15	112.36	0.37	1.666	5.17
6	83.28	0.51	0.774	2.40	16	117.20	0.30	0.864	2.68
7	84.44	0.52	2.853	8.86	17	120.20	0.23	0.699	2.17
8	90.12	0.47	1.780	5.52	18	127.56	0.25	1.571	4.88
9	95.20	0.41	2.427	7.54	19	132.36	0.26	2.003	6.22
10	100.40	0.40	0.706	2.19	20	144.04	0.23	2.080	6.46



PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %	PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %
1	35.12	0.19	2.050	17.76	5	128.40	0.26	1.621	14.04
2	102.92	0.10	1.548	13.41	7	130.20	0.26	1.568	13.58
3	109.40	0.13	0.523	4.53	8	139.84	0.18	0.689	5.97
4	113.16	0.15	0.564	4.89	9	144.08	0.21	1.773	15.37
5	115.64	0.15	1.139	9.87	10	151.56	0.13	0.066	0.57



PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %	PEAK #	POSITION mm	HEIGHT AU	AREA AU*mm	REL. AREA %
1	28.76	0.08	0.196	0.78	11	118.72	0.58	3.073	12.34
2	31.56	0.15	0.314	1.26	12	126.68	0.43	2.049	8.23
3	35.92	0.25	1.416	5.69	13	133.36	0.70	6.393	25.66
4	73.24	0.07	0.173	0.69	14	145.84	0.13	0.218	0.88
5	77.16	0.09	0.284	1.14	15	147.88	0.12	0.569	2.29
6	89.20	0.14	1.417	5.69	16	153.28	0.09	0.172	0.69
7	93.48	0.17	0.669	2.69	17	155.24	0.08	0.432	1.73
8	95.72	0.18	0.382	1.53	18	160.88	0.09	0.355	1.43
9	96.76	0.18	0.249	1.00	19	164.88	0.07	0.142	0.57
10	113.44	0.72	6.161	24.73	20	169.48	0.08	0.246	0.99

principales bandes de clivage obtenues à partir de l'hydrolyse acide de cette histone. Le pic # 4 (122,2 mm) du graphique # 2 correspond à l'histone H2B intacte et ses principaux peptides de clivage sont obtenus aux positions des pics 5 (139,0 mm), 8 (160,2 mm) et 9 (168,9 mm). Le profil de migration de l'histone H4 hydrolysée (graphique # 3) montre que le pic # 3 (135,0 mm) correspond à l'histone H4 non clivée. Les pics # 4 (138,4 mm) et 5 (149,6 mm) correspondent aux peptides produits par l'hydrolyse de l'histone H4. Malheureusement ces trois témoins de protéine ne produisent pas de bandes de clivage correspondant à celles produites par la bande ϕ hydrolysée.

Sur le graphique montrant la courbe de migration de la bande ϕ hydrolysée (graphique # 4), trois principaux pics, correspondant aux peptides de clivage de cette dernière, sont détectés. Ils sont situés aux positions 127,6 mm (pic # 18), 132,4 mm (pic # 19) et 144,0 mm (pic # 20). Précédant ces derniers, il y a un grand nombre de pics qui correspondent au bruit de fond. On peut retrouver les mêmes correspondances que celles observées à partir du gel de la figure 19. En effet, sur le graphique # 5 de la migration de la protéine HMG 1-2 hydrolysée, on peut noter un pic (# 9) en position 144,1 mm qui correspond bien avec la position du pic # 20 (144,0 mm) retrouvé pour la bande ϕ . De plus, le profil de migration de l'histone H3 hydrolysée (graphique # 6) montre une correspondance entre le pic # 13 (133,4 mm) et le pic # 19 (132,4 mm) de la bande ϕ hydrolysée. Notons que deux autres pics correspondant à des peptides de l'histone H3 sont retrouvés aux pics # 11 (118,7 mm) et 12 (126,7 mm) et que l'histone H3 non clivée est représentée par le pic # 10 (113,4 mm).

Dans le cas du pic # 18 (127,6 mm) du graphique montrant l'hydrolyse de la bande ϕ , il est difficile d'y trouver une correspondance avec un peptide de clivage produit par une ou l'autre des protéines supposément impliquées dans la réaction de réticulation. En effet, ce pic (127,6 mm) peut aussi bien correspondre au pic # 12 (126,7 mm) du graphique de l'histone H3 hydrolysée qu'au pic # 6 (128,4 mm) du profil de migration de la protéine HMG 1 (2) hydrolysée. Cette dernière bande est donc ambiguë (figure 19).

Au début de chaque tracé des graphiques, on note la présence de deux pics. Ces derniers correspondent à la migration de la glycine. La position 27 mm sur l'échelle de l'ordonnée correspond à l'origine de migration. Il y avait trop de bandes (bruit de fond) pour les échantillons des témoins d'histones H1A et H1B hydrolysés pour que l'on puisse les analyser.

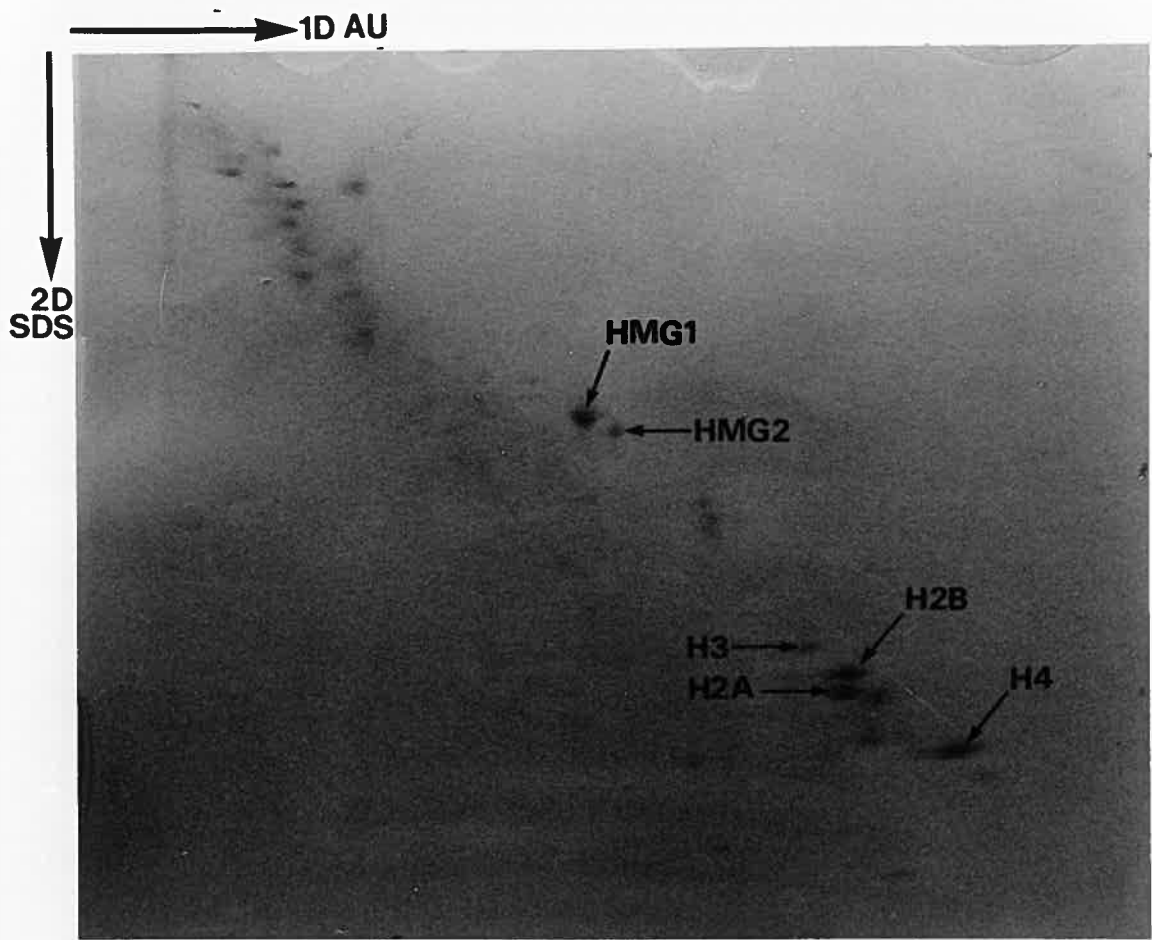
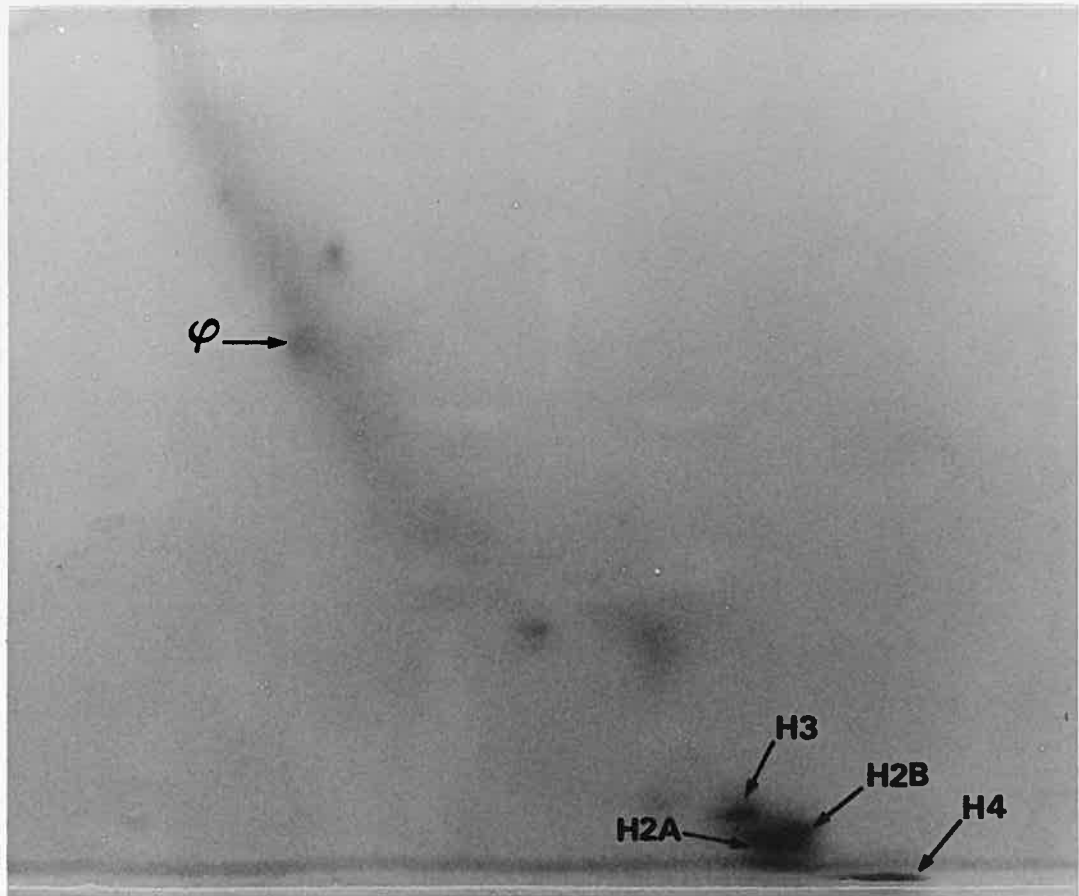
3.5 - Disparition des bandes ψ et ω lors de l'ajout des protéines HMG exogènes aux chaînes de nucléosomes.

La figure 21 présente la migration, en seconde dimension sur gel de polyacrylamide, des échantillons réticulés en présence ou non de protéines HMG. Le gel A montre l'échantillon servant de témoin c'est à dire la fraction NCh réticulée. On remarque la présence des histones du coeur nucléosomal, des histones H1 et des bandes ψ et ω . On note faiblement la présence de la zone des systèmes à deux composants

Figure 21

Migration en seconde dimension, sur gels de polyacrylamide (19%), des chaînes de nucléosomes réticulées en présence ou en absence de protéines HMG.

Les gels de 1 mm d'épaisseur ont été colorés au bleu de Coomassie. La migration en première dimension s'est effectuée sur un gel AU de 0,75 mm d'épaisseur. Les gels A et B présentent la fraction NCh réticulée par le réactif EDAC et ce en absence (gel A) ou en présence (gel B) de protéines HMG. Les échantillons ont été préparés selon les étapes de la méthode décrite à la section 2.2.5.

A**B**

formée d'histones du coeur nucléosomal.

En présence de protéines HMG exogènes, la présence des histones H1A, H1B, H2A, H2B, H3 et H4 non réticulées est encore détectée. La zone des systèmes à deux composants formée d'histones du coeur nucléosomal est aussi visualisée. Cependant on note l'accentuation de la bande ϕ . De plus, on ne retrouve plus la présence des bandes ψ et ω , bandes de réticulation contenant l'histone H1 (Boulikas, 1980). L'ajout des protéines HMG aux chaînes de nucléosomes permet donc l'accentuation de la bande ϕ et la disparition des bandes ψ et ω .

Enfin, un faible taux de protéolyse est remarqué sur les gels, surtout pour les histones H1A et H1B. Ici aussi, la présence des histones non réticulées montre que la réaction de réticulation n'est pas complète.

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 - Extraction des protéines HMG.

Afin de pouvoir atteindre les objectifs du projet de recherche, il était important d'obtenir des protéines HMG 1 et 2 afin de pouvoir les utiliser ultérieurement dans les réactions de réticulation. Lors de l'extraction des protéines HMG à partir d'un homogénat de thymus de veau (figure 9), on a pu remarquer une bonne séparation car la présence des protéines HMG 1 et 2 y est évidente. On retrouve également la présence des protéines HMG 14 et 17 en plus faible quantité. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un taux de protéolyse plus faible à l'égard des protéines HMG de hautes masses moléculaires, les protéines HMG 14 et 17 subissant alors une protéolyse plus rapide.

4.2 - Réactions de réticulation dans les fractions DS et "noyaux digérés".

Il était également nécessaire de mettre en évidence une fraction de la chromatine qui contienne à la fois les histones du coeur nucléosomal et les protéines HMG 1 et 2, éléments essentiels à la réalisation du projet de recherche. De plus, il fallait obtenir une fraction dans laquelle les protéines HMG étaient en contact électrostatique avec les histones situées à l'intérieur du nucléosome. En effet, si cette condition n'est pas remplie, la réaction de réticulation ne sera alors pas significative, les protéines HMG libres en solution pouvant être réticulées avec d'autres histones que celle avec laquelle elles sont en interaction à l'état natif.

Par l'analyse sur gel des protéines contenues dans la fraction DS (figures 11, 12 et 13), on observe que cette fraction contient à la fois les histones du coeur nucléosomal (résultats de la précipitation à l'acide sulfurique) et les protéines HMG 1 et 2 (résultats de l'expérience de poly(ADP-ribosylation)). Cependant les protéines HMG contenues dans cette fraction ne semblent pas être en liaison électrostatique avec les histones du coeur nucléosomal. En effet, la figure 15 ne montre pas de trace de protéines HMG 1 et 2 qui auraient pu migrer avec les nucléosomes. On n'y observe que les bandes correspondant aux histones du coeur nucléosomal. Comme il n'y a pas de protéines HMG qui migrent avec les nucléosomes dans le gel d'agarose, ces dernières seraient donc, pour la plupart, des protéines relâchées en solution lors de la digestion à la nucléase micrococcal. Notons que la migration de la fraction DS sur un gel d'agarose natif a pour but de ne briser aucune interaction électrostatique durant l'électrophorèse. De cette façon, si les protéines HMG 1 et 2 dans cette fraction étaient liées électrostatiquement aux nucléosomes, celles-ci auraient migré avec ces derniers et en analysant les bandes ainsi obtenues du gel d'agarose sur le gel Laemmli, on aurait retrouvé des bandes correspondant aux histones du coeur nucléosomal ainsi qu'aux protéines HMG.

Comme les résultats démontrent qu'il n'y a pas d'évidence pour la présence d'une liaison électrostatique entre les protéines HMG et les nucléosomes dans la fraction DS, cette dernière n'est donc pas la fraction recherchée pour les expériences de réticulation.

Au contraire la fraction "noyaux digérés" semble être une fraction qui se prête mieux aux expériences de réticulation. Comme dans la fraction DS, la présence des histones du coeur nucléosomal ADP-ribosylées (figure 13) ainsi que les protéines HMG 1 et 2 mono(ADP-ribosylées) (figure 13) est nettement détectée. De plus, la liaison des protéines HMG 1 et 2 aux nucléosomes dans cette fraction semble être assez spécifique. En effet, à une concentration en sel de 0,35 M (figure 18), beaucoup de protéines HMG 1 et 2 sont relâchées de la chromatine suggérant que plusieurs de ces dernières restent liées électrostatiquement à la chromatine. Il existe donc une spécificité de liaison, les protéines HMG 1 et 2 ne se liant pas à n'importe quel site sur le nucléosome. Si cette liaison n'avait pas été spécifique, les protéines HMG en contact électrostatique un peu partout sur le nucléosome se seraient déplacées à l'ajout d'une très minime quantité de sel. Les résultats démontrent que certaines sont déplacées à ce moment, cependant, d'autres restent liées jusqu'à l'obtention d'une concentration de 0,35 M de sel, concentration à laquelle s'effectue l'extraction des protéines HMG à partir de la chromatine (Weisbrod et Weintraub, 1979).

Une certaine quantité de protéines HMG 1 et 2 est donc liée spécifiquement à la chromatine dans la fraction "noyaux digérés". A ce sujet il serait bon de noter qu'à partir de résultats de reconstitution, Bernués et Querol (1989) ont proposé que les protéines HMG 1 et 2 semblaient avoir des sites de haute et de basse affinité dans la chromatine.

Comme la fraction "noyaux digérés" contient à la fois les histones du coeur nucléosomal et les protéines HMG 1 et 2 et que ces deux éléments sont de plus en contact électrostatique dans cette fraction, la réaction de réticulation a donc été effectuée dans cette dernière. L'agent de réticulation utilisé (EDAC) ne liant que les résidus en contact, il est fort probable de retrouver un système formé que de deux composantes soit de la protéine HMG 1(2) et d'une des histones du coeur nucléosomal.

La réaction de réticulation effectuée dans la fraction "noyaux digérés", (figure 16B), montre des bandes correspondant aux histones du coeur nucléosomal qui sont assez évidentes à cause de la grande quantité de protéines retrouvées dans cette fraction. Il en est de même pour les bandes correspondant aux systèmes à double composantes formés des histones du coeur nucléosomal. On retrouve la présence des bandes ψ et ω ainsi que d'une nouvelle bande nommée ϕ . En superposant les deux gels (A et B) de la figure 16, il est possible de voir que la bande ϕ n'est pas présente sur le gel A qui contient l'échantillon servant de témoin. La bande ϕ est donc une nouvelle bande créée par réaction de réticulation. Cette bande semble correspondre au système à deux composantes attendu. En effet, la bande ϕ est située dans la région des systèmes à double composantes et pourrait, par son profil de migration (masse moléculaire), contenir à la fois la protéine HMG 1(2) et une des histones du coeur nucléosomal. Notons que cette bande se retrouve juste sous les bandes ψ et ω . De plus, on ne retrouve plus les bandes correspondant aux protéines HMG 1 et 2 retrouvées sur le gel

A contenant l'échantillon témoin, bandes qui ont disparu lors de l'ajout de l'agent réticulant (gel B).

Enfin, la figure 21 montre l'accentuation de la bande ϕ en ajoutant, aux chaînes de nucléosomes en solution, des protéines HMG 1 et 2 exogènes lors de la réaction de réticulation. Ceci appuie l'interprétation que la bande ϕ serait le résultat de la réticulation de la protéine HMG 1(2) avec une histone du coeur nucléosomal. De plus, si on effectue la réaction de réticulation dans la fraction "noyaux digérés" préalablement lavée avec des concentrations en sel de 0,14, 0,20 et 0,30 M, on obtient les mêmes résultats (non montrés) que ceux obtenus sur le gel B de la figure 16. Ceci suggère donc que la bande ϕ retrouvée sur ce gel (fraction "noyaux digérés" réticulée) pourrait provenir de deux éléments réticulés ensemble (protéine HMG 1(2) et une des histone du coeur nucléosomal), éléments qui étaient, avant la réaction, en contact électrostatique spécifique. La bande ϕ du gel B de la figure 16 a donc été découpée et analysée.

4.3 - Hydrolyse acide de la bande ϕ obtenue dans la fraction "noyaux digérés" réticulée.

L'hydrolyse acide de la bande ϕ ne démontre pas de résultats très clairs car il est difficile d'en obtenir de bons avec la méthode utilisée ici. En effet, les manipulations entourant cette hydrolyse ont été effectuées à maintes reprises pour la bande en question et ce, sans l'obtention de meilleurs résultats. Ceci pourrait être la cause de

liaisons intramoléculaires qui peuvent se former lors de la réaction de réticulation. En effet, même si l'agent de réticulation utilisé produit un lien amide entre deux molécules en contact électrostatique, il peut aussi aider à la formation de liens à l'intérieur d'une même molécule. A ce moment, il est difficile d'obtenir un patron de clivage net car chaque molécule peut elle-même posséder une série de liens internes entre des groupements amines et carboxyliques. L'hydrolyse acide des témoins d'histones produit de meilleurs résultats qui sont d'autant plus faciles à interpréter.

On peut enfin remarquer que la réaction d'hydrolyse n'est pas complète (figure 19) car il reste une assez grande quantité de protéines non clivées après la réaction. Par exemple, pour le témoin de l'histone H2A hydrolysée, la bande correspondant à la protéine intacte demeure la plus dense des bandes contenues dans le patron de clivage. Néanmoins, on doit faire attention ici. On ne veut pas effectuer une hydrolyse complète car l'obtention d'une trop grande série de bandes de clivage rendrait l'interprétation des résultats encore plus difficile. Ici l'hydrolyse n'est que partielle, elle coupe préférentiellement les liens Asp-acide aminé contenus dans les protéines. Comme l'agent de réticulation utilisé produit un lien amide entre deux protéines, la situation idéale de ne couper que le lien de réticulation produit lors de la réaction en présence d'EDAC est impossible à réaliser. Cependant, on peut dire qu'une trop grande quantité de protéines demeure non clivée. Il y a un nombre d'unités des résidus Asp chez les histones qui permet d'obtenir des peptides caractéristiques pour chacune des molécules. Seulement les grands peptides de 35 acides aminés ou plus

peuvent cependant être analysés dans les conditions d'électrophorèse employées.

Selon les résultats obtenus, la bande ϕ serait composée de l'histone du coeur nucléosomal H3 et de la protéine HMG 1(2). En effet, l'histone H3 hydrolysée produit une bande de clivage qui correspond à une des bandes produites par l'hydrolyse de la bande ϕ . Il en est de même pour la protéine HMG 1(2) hydrolysée. La bande ϕ serait donc le produit de réticulation entre ces deux protéines. Sur les graphiques de la figure 20, les résultats sont plus facile à visualiser. On remarque que chacun des pics correspondant aux témoins d'histones non clivés se retrouvent dans le même ordre (position en millimètre) que celui observé sur le gel de la figure 19. Ceci signifie donc que la position des pics d'un graphique par rapport à un autre peut être comparée.

On y observe aussi la même correspondance que celle retrouvée sur le gel de la figure 19. Il n'y a pas, pour les témoins des histones H2A, H2B et H4, des bandes de clivage qui correspondent à 1 mm près à une bande d'hydrolyse de la bande ϕ . Il y en a cependant pour les standards histone H3 et protéine HMG 1(2) hydrolysés. Une bande de clivage de la bande ϕ est ambiguë (pic #18, 127,6 mm) mais elle peut aussi bien correspondre à une bande de clivage de la protéine HMG 1(2) ou de l'histone H3 hydrolysées. Il semble donc évident, selon le patron obtenu, que la bande ϕ est formée de ces deux protéines. Par Western blot, on aurait pu démontrer que les complexes étaient composés des protéines HMG 1 et 2 et H3 ou H3B. L'expérience a été tentée avec la collaboration précieuse de Sylvianne Muller (Strasbourg), cependant,

les anticorps dirigés contre les protéines HMG 1 et 2 n'étaient pas spécifiques. Les résultats n'ont donc pas été montrés.

Depuis leur premier isolement et leur caractérisation comme étant des protéines chromosomales, la localisation et l'interaction des protéines HMG dans la chromatine a été un sujet de controverse. Les protéines HMG 14 et 17 pourraient être en interaction avec les points d'entrée et de sortie de l'ADN dans le coeur nucléosomal (Mardian et al., 1980; Shick et al., 1985). Par contre, d'autres chercheurs ont postulé une interaction avec l'histone H2A (Cook et al., 1986; 1989).

Cependant beaucoup moins d'informations ont été obtenues sur la localisation des protéines HMG 1 et 2 à l'intérieur de la chromatine. Elles sont néanmoins deux autres protéines HMG non moins importantes pour lesquelles la position par rapport à l'ADN ou aux histones n'est encore connue. Par les expériences de réticulation sur la chromatine digérée en présence de l'agent réticulant à distance zéro (EDAC), on peut postuler que les protéines HMG 1 et 2 semblent être en contact avec l'histone H3 à l'intérieur du nucléosome. En utilisant un agent réticulant photochimique, l'interaction des protéines HMG 1 et 2 avec l'histone H3 dans la chromatine a déjà été détectée (Stross, 1987). D'autres chercheurs ont obtenu auparavant les mêmes résultats, cependant avec des oligomères en solution (Bernués et al., 1983; 1986). Dans ces derniers travaux (Bernués et al., 1986), l'interaction des protéines HMG 1 et 2 avec les histones du coeur nucléosomal sous forme de dimères (H2A X H2B) et de tétramères (H3 X H4)₂ a été étudiée à l'aide d'un agent réticulant photochimique. Dans le cas du tétramère,

l'interaction des protéines HMG 1 et 2 semble se faire via l'histone H3. Avec les résultats décrits plus haut, toutes les interactions formellement décrites en solution contenant ces oligomères purifiés ont été confirmées dans la chromatine. Cependant, par des expériences de reconstitution, certains de ces chercheurs (Bernués et Querol, 1989) ont récemment montré que les protéines HMG 1 et 2 sont en interaction avec les histones H1 et H2A-H2B. Ces derniers résultats viennent donc à l'encontre de ceux énoncés ici. Cependant comme on a pu le voir plus haut et même dans l'introduction, ce sujet amène beaucoup de controverses. Il y a donc beaucoup de travaux à faire afin de mieux comprendre la structure de la chromatine, les contacts histones-histones et la localisation des protéines chromosomales non histones.

4.4 - Disparition des bandes ψ et ω lors de l'ajout de protéines HMG 1 et 2 aux chaînes de nucléosomes pour la réaction de réticulation.

Sur la figure 21 on peut noter, lors de l'ajout des protéines HMG aux chaînes de nucléosomes en présence de l'agent réticulant, la disparition des bandes ψ et ω initialement retrouvées dans les chaînes de nucléosomes seules réticulées et la présence de la bande ϕ . Ces résultats suggèrent la possibilité que les protéines HMG 1 et 2 compétitionnent pour le même site sur le nucléosome que l'histone H1. En effet, il est connu que les bandes ψ et ω sont le produit de la réticulation de l'histone H1 avec l'histone H2A (Boulikas, 1980). En

ajoutant des protéines HMG 1 et 2 aux chaînes de nucléosomes, il y aurait alors déplacement des histones H1 (disparition des bandes ψ et ω) et liaison électrostatique des protéines HMG 1 et 2 avec une des histones du coeur nucléosomal (présence de la bande ϕ). Ceci n'est cependant qu'une hypothèse qui pourrait appuyer celle énoncée par Cary et al. (1987) disant que les protéines HMG 1 et 2 se lient au lien d'ADN et déplacent ainsi l'histone H1, donnant un état de la chromatine qui requiert spécifiquement l'absence de cette histone, c'est à dire la chromatine active (voir introduction).

Cette hypothèse va cependant encore à l'encontre des résultats obtenus par Bernués et Querol (1989) qui mentionnent que les protéines HMG 1 et 2 ne peuvent remplacer l'histone H1. Néanmoins, les résultats obtenus ici ne s'opposent pas à ceux obtenus pour l'expérience de réticulation décrite dans les pages précédentes de ce travail car même si les protéines HMG 1 et 2 remplacent les histones H1 sur le nucléosome ceci n'exclut pas la possibilité qu'elles soient à ce moment en contact avec une autre histone que celle en contact avec l'histone H1. Ceci suppose alors des sites de liaison très près mais différents.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord témoigner ma gratitude au docteur Teni Boulikas, mon directeur de recherche, à qui je dois l'entreprise et le développement de ce projet.

Je voudrais aussi particulièrement remercier Dr. Gilles Dupuis (co-directeur de mes travaux de recherche) pour son aide précieuse à la réalisation finale du projet ainsi qu'à la rédaction de ce mémoire.

A ce titre, je remercie également Dr. David Gibson.

Aux professeurs Jean-Guy Lehoux et Guy Poirier ainsi que ceux cités précédemment, j'exprime ma gratitude pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Au Dr. Jurgen Sygusch, je témoigne ma gratitude pour ses judicieux conseils

Je voudrais, de plus, remercier Gaétanne Dumont pour avoir assumé le travail ardu de la dactylographie de ce mémoire ainsi que les fonds FCAR pour leur aide financière précieuse.

Enfin, je remercie ma famille et mon ami Stéphan pour leur soutien moral sans lequel la réalisation de ce travail aurait été bien difficile.

BIBLIOGRAPHIE

- Althaus, F. R. et Richter, R. (1987). Poly(ADP-ribosylation) reaction in chromatin. *Molec. Biol. Biochem. Biophys.* 37, 1-237.
- Bernués, J., Querol, E., Martinez, P., Barris, A., Espel, E. et Lloberas, J. (1983). Detection by chemical cross-linking of interaction between High Mobility Group protein 1 and histones oligomers in free solution. *J. Biol. Chem.* 258, 11 020-11 024.
- Bernués, J., Espel, E. et Querol, E. (1986). Identification of the core-histone-binding domains of HMG1 and HMG2. *Biochim. Biophys. Acta.* 866, 242-251.
- Bernués, J. et Querol, E. (1989). Non-random reconstitution of HMG 1 and HMG2 in chromatin: determination of histone contacts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1 008, 52-61.
- Bianchi, M.E., Beltrame, M. et Paonessa, G. (1989). Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG 1. *Science* 243, 1056-1059.
- Bonne, C., Sautiere, P., Duguet, M. et De Recondo, A-M. (1982). Identification of a single-stranded DNA binding protein from rat liver with High Mobility Group protein 1. *J.*

Biol. Chem. 257, 2722-2725.

Bonne-Andrea, C., Harper, f., Sobczak, J. et De Recondo, A-M. (1984).

Rat liver HMG 1: a physiological nucleosome assembly factor. EMBO.J. 3, 1193-1199.

Boulikas, T. (1979) Ph.D. Thesis, University of Texas, Health Science Center at Dallas.

Boulikas, T., Wiseman, J.M. et Garrard, W.T. (1980). Points of contact between histone H1 and the histone octamer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 127-131.

Boulikas, T. (1987a). Nuclear envelope and chromatin structure. Int. Rev. Cytol. Suppl. 17, 493-571.

Boulikas, T. (1987b). Functions of chromatin and the expression of genes. Int. Rev. Cytol. Suppl. 17, 599-684.

Boulikas, T. (1988). At least 60 ADP-ribosylated variant histones are present in nuclei from dimethylsulfate-treated and untreated cells. EMBO J. 7, 57-67.

Boulikas, T. (1990). Altered nucleosomes structure involving mono(ADP-ribosilated) histones at the vicinity to the nuclear matrix. Sous presse.

- Boulikas, T. (1989). DNA strand breaks alter histone ADP-ribosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 3499-3503.
- Boulikas, T., Bastin B., Boulikas, P. et Dupuis, G. (1990). Increase in histone poly(ADP-ribosylation) in mitogen-activated lymphoid cells. Exp. Cell Res. Sous presse.
- Bradbury, E.M. (1983). High mobility group proteins 14 and 17: chromatin-associated proteins. Ciba Found. Symp. 93, 246-266.
- Butler, A.P., Mardian, J.K.W. and Olins, D.E. (1985). Nonhistone chromosomal protein HMG1 interactions with DNA. J. Biol. Chem. 260, 10613-10620.
- Cary, P.D., Crane-Robinson, C., Bradbury, E.M., Javaherian, K., Goodwin, G.H. et Johns, E.W. (1976). Conformational studies of two non-histone chromosomal proteins and their interactions with DNA. Eur. J. Biochem. 62, 583-590.
- Cary, P.D., Turner, C.H., Mayes, E. et Crane-Robinson, C. (1983). Conformation and domain structure of the non-histone chromosomal proteins, HMG 1 and 2. Eur. J. Biochem. 131, 367-374.
- Cary, P.D., Turner, C.H., Leung, I., Mayes, E. et Crane-Robinson, C. (1984). Conformation and domain structure of the non-histone chromosomal proteins HMG1 and 2. Eur. J.

Biochem. 143, 323-330.

Chahal, S.S., Matthews, H.R. et Bradbury, E.M. (1980). Acetylation of histone H4 and its role in chromatine structure and function. Nature 287, 76-79.

Chambers, A.A. et Rill, R.L. (1984). Non-histone proteins of soluble nucleoproteins released from mouse myeloma nuclei by mild micrococcal nuclease digestion. Biochim. Biophys. Acta 782, 210-219.

Chambon, P., Weill, J.D., Doly, J., Strosser, M.T. and Mand, D. (1966). On the Formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 638-643.

Cook, G., Yau, P., Yasuda, H., Traut, R.R. et Bradbury, E.M. (1986). High Mobility Group protein 17 cross-links primarily to histone H2A in the reconstituted HMG 17-nucleosome core particule complex. J. Biol. Chem. 261, 16185-16190.

Cook, G., Minch, M., Schroth, G.P. et Bradbury, E.M. (1989). Analysis of the binding of High Mobility Group protein 17 to the nucleosome core particule by ^1H NMR Spectroscopy. J. Biol. Chem. 264, 1799-1803.

- Dorbic, T. et Wittig, B. (1986). Isolation of oligonucleosomes from active chromatin using HMG 17-specific monoclonal antibodies. *Nucl. acids Res.* 14, 3363-3376.
- Dorbic, T. et Wittig, B. (1987). Chromatin from transcribed genes contains HMG 17 only downstream from the starting point of transcription. *EMBO J.* 6, 2393-2399.
- Druckmann, S., Mendelson, E., Landsman, D. et Bustin, M. (1986). Immunofractionation of DNA sequences associated with HMG-17 in chromatin. *Exp. Cell Res.* 166, 486-496.
- Duguet, M. et De Recondo, A-M. (1978). A deoxyribonucleic acid unwinding protein isolated from regenerating rat Liver. *J. Biol. Chem.* 253, 1660-1666.
- Eckner, R. et Birnstiel, M. (1989). Cloning of cDNAs coding for human HMG I and HMG Y proteins: both are capable of binding to the octamer sequence motif. *Nucl. Acids Res.* 17, 5947-5959.
- Einck, L. et Bustin, M. (1983). Inhibition of transcription in somatic cells by microinjection of antibodies to chromosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6735-6739.
- Elgin, S.C.R. et Weintraub, H. (1975). Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 725-724.

- Elton, T.S. et Reeves, R. (1986). Purification and postsynthetic modifications of friend erythroleukemic cell high mobility group protein HMG-I. *Anal. Biochem.* 157, 53-62.
- Elton, T., Nissen, M.S. et Reeves, R. (1987). Specific A-T DNA sequence binding of RP-HPLC purified HMG-I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 260-265.
- Fakan, S. et Bernhard, W. (1971). Localisation of rapidly and slowly labelled nuclear RNA as visualized by high resolution autoradiography. *Exp. Cell Res.* 67, 129-141.
- Felsenfeld, G. (1978). Chromatin. *Nature* 271, 115.
- Ferro, A.M. et Olivera, B.M. (1984). Poly (ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J. Biol. Chem.* 259, 547-554.
- Gazit, B., Panet, A. et Cedar, H. (1980). Reconstitution of a deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1787-1790.
- Giri, C.P., West, Michael H. P. et Smulson, M. (1978). Nuclear protein modification and chromatin substructure.1. Differential poly(adenosine diphosphate) ribosylation of chromosomal proteins in nuclei versus isolated nucleosomes. *Biochem.*

17, 3495-3504.

Goodwin, G.H., Sanders, C. et Johns, E.W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* 38, 14-19.

Goodwin, G.H., Mattew, C.G.P., Wright, C.A., Venkov, C.D. et Johns, E.W. (1979). Analysis of the high mobility group proteins associated with salt-soluble nucleosomes. *Nucl. Acids Res.* 7, 1815-1835.

Goodwin, G.H., Cockerill, P.N., Kellam, S. et Wright, C.A. (1985). Fractionation by high-performance liquid chromatography of the low-molecular-mass high-mobility-group (HMG) chromosomal proteins present in proliferating rat cells and an investigation of the HMG proteins present in virus transformed cells. *Eur. J. Biochem.* 149, 47-51.

Hancock, R. et Boulikas, T. (1982). Functional organization in the nucleus. *Int. Rev. Cytol.* 79, 165-214.

Hancock, R. et Hughes, M.E. (1982). Organisation of DNA in the interphase nucleus. *Biol. Cell* 44, 201-212.

Harrington, R.E., Uberbacher, E.C. et Bunick, G.J. (1982). Conformation of the HMG 14 nucleosome core complex from flow birefringence. *Nucl. Acids Res.* 10, 5695-5708.

- Hayashi, K., Tanaka, M., Shimada, T., Miwa, M. et Sugimura, T. (1983).
Size and shape of poly (ADP-ribose): examination by gel
filtration, gel electrophoresis and electron microscopy.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 102-107.
- Hultesky, A., Niedergang, C., Fréchette, A., Aubin, R., Gaudreau, A. et
Poirier, Guy G. (1985). Sequential ADP-ribosylation
pattern of nucleosomal histones: ADP-ribosylation of
nucleosomal histones. Eur. J. Biochem. 146, 277-285.
- Hultesky, A., de Murcia, G., Muller, S., Hengartner, M., Ménard, L.,
Lamarre, D. et Poirier, Guy G. (1989). The effect of
poly(ADP-ribosylation) on native and H1-depleted
chromatin. J. Biol. Chem. 264, 8878-8886.
- Isackson, P.J., Fishback, J.L., Bidney, D.L. et Reeck, G.R. (1979).
Preferential affinity of high molecular weight High
Mobility Group non-histone chromatin proteins for
single-stranded DNA. J. Biol. Chem. 254, 5569-5572.
- Isackson, P.J., Clow, L.G. et Reeck, G.R. (1981). Comparison of the
salt dissociations of high molecular weight HMG
non-histone chromatin proteins from double-stranded DNA
and from chromatin. FEBS Lett. 125, 30-34.
- Jackson, J.B., Pollock, J.M.Jr. et Rill, R.L. (1979). Chromatin

fractionation procedure that yields nucleosomes containing near-stoichiometric amounts of High Mobility Group non-histone chromosomal proteins. *Biochemistry* 18, 3739-3748.

Jackson, J.B. et Rill, R.L. (1981). Circular dichroism, thermal denaturation, and deoxyribonuclease I digestion studies of nucleosomes highly enriched in High Mobility Group proteins HMG1 et HMG2. *Biochemistry* 20, 1042-1046.

Javaherian, K., Liu, L.F. et Wang, J.C. (1978). Nonhistone proteins HMG1 et HMG2 change the DNA helical structure. *Science* 199, 1345-1346.

Javaherian, K., Sadeghi, M. et Liu, L.F. (1979). Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 unwind DNA double helix. *Nucl. Acids Res.* 6, 3569-3579.

Johnson, K.R., Lehn, D.A., Elton, T.S., Barr, P.J. et Reeves, R. (1988). Complete murine cDNA sequence, genomic structure, and tissue expression of the high mobility group HMG-I (Y). *J. Biol. Chem.* 263, 18338-18342.

Karlson, J.R., Mork, E., Holtlund, J., Laland, S.G. et Lund, T. (1989). The amino sequence of the chromosomal protein HMG-Y, its relation to HMG-I and possible domains for the preferential binding of the proteins to stretches of A-T

base pairs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 646-651.

Kawaishi, M. Ueda, K. et Hayaishi, O. (1981). Multipel Autopoly (ADP-ribosyl) ation of rat liver poly (ADP-ribose) synthetase. *J. Biol. Chem.* 256, 9483-9489.

Klug, A., Rohodes, D., Smith, J. Finch, J.T. et Thomas, J.O.(1980). Alow resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Nature* 287, 509-516.

Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histone and DNA. *Science* 184, 868-871.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.

Landsman, D., Soares, N., Gonzalez, F.J. et Bustin, M. (1986a). Chromosomal protein HMG-17: complete humain cDNA sequence and evidence for a multigene family. *J. Biol. Chem.* 261, 7479-7484.

Landsman, D., Srikantha, T., Westermann, R. et Bustin, M. (1986b). Chromosomal protein HMG-14. *J. Biol. Chem.* 261, 16082-16086.

Landsman, D., Srikantha, T. et Bustin, M. (1988). Single copy gene for

the chicken non-histone chromosomal protein HMG-17. *J. Biol. Chem.* 263, 3917-3923.

Landsman, D., McBride, O.W. et Bustin, M. (1989). Human non-histone chromosomal protein HMG-17: identification, characterization, chromosome localization and RFLPs of a Functional gene from the large multigene Family. *Nucl. acids Res.* 17, 2301-2314.

Lee, K.L.D., Pentecost, B.T., D'Anna, J.A., Tobey, R.A., Gurley, L.R. et Dixon, G.H. (1987). Characterization of cDNA sequences corresponding to three distinct HMG-1 mRNA species in line CHO chinese hamster cells and cell cycle expression of the HMG-1 gene. *Nucl. Acids Res.* 15, 5051-5058.

Lehn, D.A., Elton, T.S., Johnson, K.R. et Reeves, R. (1988). Structure of the High mobility group protein I. *Biochem. Int.* 16, 963-971.

Levy, W.B., Wong, N.C.W., Watson, D.C., Peters, E.H. et Dixon, G.H. (1977). Structure and function of the low-salt extractable chromosomal proteins. Preferential association of trout testis proteins H6 and HMGT with chromatin regions selectively sensitive to nucleases. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 793-801.

Levy, W.B. et Dixon, G.H. (1978). A study of the localization of high

mobility group proteins in chromatin. *Can. J. Biochem.*
56, 480-491.

Levy, W.B., Connor, W. et Dixon, G.H. (1979). A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequences contains High Mobility Group proteins as major structural components. *J. Biol. Chem.* 254, 609-620.

Lund, T., Holtlund, J., Fredriksen, M. et Ialand, S.G. (1983). On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett.* 163-167.

Malik, N., Smulson, M. et Bustin, M. (1984). Enrichment of acetylated histones in polynucleosomes containing High Mobility Group protein 17 revealed by immunoaffinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 259, 699-702.

Mandel, D., Okasaki, H. et Niedergang, C. (1982). Poly (adenosine diphosphate ribose). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 27, 1-51.

Mardian, J.K.W., Paton, A.E., Bunick, G.J. et Olins, D.E. (1980). Nucleosome cores have two specific binding sites for non-histone chromosomal proteins HMG14 and HMG17. *Science* 209, 1534-1536.

- Mayes, E.L. Dans "The HMG chromosomal proteins." Johns, E.W., Ed. (1982), Academic Press, New York, 9-40.
- Miwa, M., Tanaka, M., Matsushima, T. et Sugimura, T. (1974). Purification and properties of a glycohydrolase from calf thymus splitting ribose-ribose linkages of poly (Adenosine Diphosphate Ribose). J. Biol. Chem. 249, 3475-3482.
- Miwa, M., Ishihara, M., Takishima, S., Takasuka, N., Maeda, M., Yamaizumi, Z. et Sugimura, T. (1981). The branching and linear portions of poly (Adenosine Diphosphate Ribose) have the same (1 2) ribose-ribose linkage. J. Biol. Chem. 256, 2916-2921.
- Oka, J., Ueda, K., Hayaishi, O., Komura, H. et Natanishi, K. (1984). ADP-ribosyl protein lyase. J. Biol. Chem. 259, 986-995.
- Paulson, J.R. et Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. Cell 12, 817-828.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. Nature 335, 683-689.
- Reeck, G.R., Isackson, P.J. et Teller, D.C. (1982). Domain structure in high molecular weight high mobility group non-histone chromatin proteins. Nature 300, 76-78.

- Reeves, R., Chang, D. et Chung, S-C. (1981). Carbohydrate modifications of the high mobility group proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6704-6708.
- Reeves, R., Elton, T.S., Nissen, M.S., Lehn, D. et Johnson, K.R. (1987). Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 6531-6535.
- Renz, M., Nehls, D. et Hozier, J. (1977). Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1879-1883.
- Romani, M., Rodman, T.C., Vidali, G. et Bustin, M. (1979). Serological analysis of species specificity in the High Mobility Group chromosomal proteins. J. Biol. Chem. 254, 2918-2922.
- Russnak, R.H., Candido, E.P.M. et Astell, C.R. (1988). Interaction of the mouse chromosomal protein HMG-I with the 3' ends of gene "in vitro". J. Biol. Chem. 263, 6392-6399.
- Sandeen, G., Wood, W.I. et Felsenfeld, G. (1980). The interaction of high mobility proteins HMG 14 and 17 with nucleosomes, Nucl. Acids Res. 8, 3757-3775.

- Schröter, H. et Bode, J. (1982). The binding sites for large and small High-Mobility-Group (HMG) proteins. *Eur. J. Biochem.* 127, 429-436.
- Scovell, W.M., Muirhead, N. et Kross, L.R. (1987). Cis-Diamminedichloroplatinum (II) selectively cross-links High Mobility Group proteins 1 and 2 to DNA in micrococcal nuclease accessible regions of chromatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 826-835.
- Seyedin, S.M. et Klistles, W.S. (1979). Levels of chromosomal proteins High Mobility Group 2 parallel the proliferative activity of testis, skeletal muscle and other organs. *J. Biol. Chem.* 254, 11264-11271.
- Seyedin, S.M., Pehrson, J.R. et Cole, R.D. (1981). Loss of chromosomal high mobility group proteins HMG1 and HMG2 when mouse neuroblastoma and friend erythroleukemia cells become committed to differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 5988-5992.
- Shick, V.V., Belyavshy, A.V. et Mirzabekov, A.D. (1985). Primary organization of nucleosomes: Interaction of non-histone High Mobility Group proteins 14 and 17 with nucleosomes, as revealed by DNA-proteins crosslinking and immuno-affinity isolation. *J. Mol. Biol.* 185, 329-339.

- Solomon, M., Strauss, F. et Varshavsky, A. (1986). A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A-T base pairs in duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1276-1280.
- Spiker, S., Mardian, J.K.W. and Isenberg, I. (1978). Chromosomal HMG proteins occur in three eucaryotic kingdoms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 129-135.
- Srikantha, T., Landsman, D. et Bustin, M. (1988). Cloning of the chicken chromosomal protein HMG-14 cDNA reveals a unique protein with a conserved DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 263, 13500-13503.
- Stoute, J.O. et Marzluff, W.F. (1982). HMG-proteins 1 and 2 are required for transcription of chromatin by endogenous RNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1279-1284.
- Strauss, F. et Varshavsky, A. (1984). A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* 37, 889-901.
- Stros, M., Shick, V.V., Belyavsky, A.V. et Mirzabekov, A.D. (1985). Interaction of high mobility group proteins HMG1 and HMG2 with nucleosomes studied by gel electrophoresis. *Molec.*

Biol. Rep. 10, 221-226.

Stros, M. (1987). Binding of non-histone chromosomal protein HMG 1 to histone H1 in nucleosomes detected by photochemical cross-linking. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147, 301-308.

Tan, E.M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv. Immunol.* 44, 93-151.

Tremethick, D.J. et Molloy, P.L. (1986). High Mobility Group proteins 1 and 2 stimulate transcription "in vitro" by RNA polymerase II and III. *J. Biol. Chem.* 261, 6986-6992.

Tremethick, D.J. et Molloy, P.L. (1988). Effects of high mobility group proteins 1 and 2 on initiation and elongation of specific transcription by RNA polymerase II "in vitro". *Nucl. Acids Res.* 16, 11107-11123.

Tremethick, D.J. et Molloy, P.L. (1989). Stimulation of transcription from different RNA polymerase II promoters by high mobility group proteins 1 and 2. *FEBS lett.* 242, 346-350.

Tsuda, K., Kikuchi, M., Mori, K., Waga, S. et Yoshida, M. (1988). Primary structure of non-histone protein HMG-1 revealed by the nucleotide sequence. *Biochemistry* 27, 6159-6163.

- Uberbacher, E.C., Mardian, J.K.W., Rossi, R.M., Olins, D.E. et Bunick, G.J. (1982). Neutron scattering studies and modeling of high mobility group 14 core nucleosome complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 5258-5262.
- Ueda, K., Nacumiya, S., Miyakawa, N. et Hayaishi, O. (1972). Poly ADP-ribose glycohydrolase from rat liver nuclei, a novel enzyme degrading the polymer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 516-523.
- Vidali, G., Boffa, L.C. et Allfrey, V.G. (1977). Selective release of chromosomal proteins during limited DNase I digestion of avian erythrocyte chromatin. Cell 12, 409-415.
- Waga, S., Mizuno, S. et Yoshida, M. (1989). Nonhistone proteins HMG1 and HMG2 suppress the nucleosome assembly at physiological ionic strength. Biochim. Biophys. Acta 1007, 209-214.
- Walker, J. M., Hastings, J.R.B. et Johns, E.W. (1977). The primary structure of a nonhistone chromosomal protein. Eur. J., Biochem. 76, 461-468.
- Walker, J.M., Goodwin, G.H. et Johns, E.W. (1979). The primary structure of the nucleosome-associated chromosomal protein HMG 14. FEBS Lett. 100, 394-398.

- Walker, J.M., Gooderham, K., Hastings, J.R.B., Mayes, E. et Johns, E.W. (1980a). The primary structures of non-histone chromosomal proteins HMG 1 and 2. FEBS Lett. 122, 264-270.
- Walker, J.M., Goodwin, G.H., Smith, B.J. et Johns, E.W. Protein metabolism. Dans "Comprehensive Biochemistry". Stotz, E.H. et Neuberger, A. Eds, (1980b), New York, vol.19B.
- Walker, J.M. Dans "The HMG chromosomal proteins." Johns, E.W., Ed. (1982), Academic Press, New York, 69-87.
- Weber, S. et Isenberg I. (1980). High Mobility Group proteins of "Saccharomyces cerevisiae". Biochemistry 19, 2236-2240.
- Weintraub, H. et Groudine, M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. Science 193, 848-858.
- Weisbrod, S. et Weintraub, H. (1979). Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I - sensitive structure on globin chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 630-634.
- Weisbrod, S., Groudine, M. et Weintraub, H. (1980). Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes. Cell 19, 289-301.

- Weisbrod, S. et Weintraub, H. (1981). Isolation of actively transcribed nucleosomes using immobilized HMG 14 and 17 and an analysis of γ -globin chromatin. *Cell* 23, 391-400.
- Weisbrod, S.T. (1982). Properties of active nucleosomes as revealed by HMG 14 and 17 chromatography. *Nucl. acids Res.* 10, 2017-2042.
- Westermann, R. et Grossbach, U. (1984). Localization of nuclear proteins related to high mobility group protein 14 (HMG 14) in polytene chromosomes. *Chromosoma* 90, 355-365.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. et Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118, 197-203.
- Yau, P., Imai, B.S., Thorne, A.W., Goodwin, G.H. et Bradbury, E.M. (1983). Effect of HMG protein (7 on the thermal stability of control and acetylated Hela oligonucleosomes. *Nucl. Acids Res.* 11, 2651-2664.
- Yoshida, M. et Shimura, K. (1984). Unwinding of DNA by non-histone chromosomal protein HMG (1+2) from pig thymus as determined with endonuclease. *J. Biochem.* 95, 112-124.
- Yoshihara, K., Hashida, T., Tanaka, Y., Matsunami, N., Yamagushi, A. et Kamiya, T. (1981), Mode of enzyme-bound poly (ADP-ribose)

synthesis and histone modification by reconstituted poly (ADP-ribose) polymerase-DNA-cellulose complex. J. Biol. Chem. 256, 3471-3478.

Yoshihara, K., Itaya, A., Tanaka, Y., Ohashi, Y., Ito, K., Teraoka, H., Tsukada, H., Matsukage, A. et Kamiya, T. (1985a). Inhibition of DNA polymerase α , DNA polymerase β , terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly (ADP-ribosyl) ation reaction "in vitro". Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 61-67.

Yoshihara, K., Itaya, A., Tanaka, Y., Ohashi, Y., Ito, K., Teraoka, H., Tsukada, H., Matsukage, A. et Kamiya, T. Dans "ADP-ribosylation of proteins." Altraus, F.R., Hilz, H. et Shall, S. Eds, (1985b), Academic Press, New York, 82-92.