

## VARIATION QUANTITATIVE DE LA FRACTION D'HISTONE SPECIFIQUE AUX ERYTHROCYTES, AU COURS DU DEVELOPPEMENT DU POULET

A. MAZEN et M. CHAMPAGNE

*Centre de Recherches sur les Macromolécules,  
6, Rue Boussingault, 67-Strasbourg, France*

Reçu le 11 janvier 1969

Chromatography on carboxymethylcellulose of the trichloroacetic extract "F<sub>1</sub>" of chicken erythrocytes nuclei, yields two histone fractions: F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> the very lysine-rich histone and F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub>, the fraction specific to erythrocytes.

Aminoacid analysis and disc electrophoresis on extracts "F<sub>1</sub>" demonstrate that specific histone fraction F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub> occurs in smaller percentage in the early stages of chicken development; it increases from 6% (by weight of the total DNA) in 3 days old chicken to 16% in 21 days old chicken. But the percentage of F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> fraction (8% by weight of total DNA) remains constant in the same conditions.

Nous avons décrit récemment [1,2] une méthode de préparation simple qui permet d'isoler dans un état de pureté très satisfaisant, la fraction d'histone spécifique des érythrocytes de poulet. Cette méthode consiste à chromatographier sur carboxyméthylcellulose (CMC) le mélange d'histones obtenu en traitant les noyaux d'érythrocytes par l'acide trichloroacétique 5%. Nous adopterons par la suite la nomenclature suivante: "F<sub>1</sub>" pour l'extrait TCA 5% des noyaux; F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> pour l'histone très riche en lysine et F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub> pour l'histone spécifique aux érythrocytes, ces deux dernières étant obtenues par chromatographie sur CMC. En appliquant cette technique à du sang de poussins à différents stades du développement, nous avons montré que le pourcentage d'histone spécifique augmente progressivement dans les érythrocytes alors que la fraction d'histone très riche en lysine demeure constante au cours du développement du poussin.

Les différents extraits bruts "F<sub>1</sub>" ont été caractérisés par analyse des acides aminés et par électrophorèse en gels de polyacrylamide [3]. L'une des histones "F<sub>1</sub>" a été fractionnée sur CMC selon la méthode de Johns [4] modifiée [2]. On a pu s'assurer ainsi que le mélange d'histones "F<sub>1</sub>" chez le poussin était effectivement constitué des seules fractions F<sub>1</sub>-cF<sub>x</sub> (fraction non retenue sur la colonne), F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub>

et F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub>; elles ont les mêmes caractéristiques analytiques et électrophorétiques que les fractions correspondantes du poulet adulte.

Dans le tableau 1, nous donnons la composition en acides aminés des fractions "F<sub>1</sub>" à 4 stades de développement, et à titre de référence, la composition des fractions F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> et F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub> pour le poulet adulte.

Remarquons de suite les amino-acides qui différencient essentiellement les histones F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> et F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub>. La première est plus riche en alanine (26%) et en proline (11%) alors que la seconde est plus riche en arginine (11%), sérine (12%) et isoleucine (3%), et qu'elle est la seule des deux à contenir de l'histidine (1,40%).

Si l'on compare maintenant entre elles les trois histones "F<sub>1</sub>" de poussins et celle extraite de sang de poulet adulte, nous observons une diminution régulière du pourcentage des acides aminés typiques de l'histone F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> (proline, alanine) et une augmentation parallèle des acides aminés prédominants dans l'histone F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub> (arginine, sérine, isoleucine et histidine). Le sens de la variation est donc en faveur d'un enrichissement en histone spécifique en fonction de l'âge. A 21 jours, on a une composition globale de l'histone "F<sub>1</sub>" voisine de celle de l'adulte. On peut faire une estimation de la quantité d'histone spécifique en fonction de l'âge, en tenant compte du pour-

Tableau 1

Composition en acides aminés d'histones d'érythrocytes. Valeurs exprimées en moles pour 100 moles de tous les acides aminés.

	"F <sub>1</sub> "				F <sub>1</sub> -cF <sub>1</sub>	F <sub>1</sub> -cF <sub>3</sub>
	3 jours P 392	10 jours P 397	21 jours P 393	adulte P 390	adulte P 390	adulte P 390
lys	25.58	24.64	26.58	25.60	30.45	25.56
hist	0.59	0.84	1.04	1.00	+	1.41
arg	5.40	7.27	8.07	7.76	2.09	11.09
asp	2.16	2.12	2.18	2.14	1.71	1.65
threo	4.26	3.75	3.42	3.42	3.71	3.02
ser	8.90	9.35	9.59	9.47	5.81	12.21
glu	4.32	4.42	4.37	4.26	3.34	3.72
pro	9.12	8.85	8.35	8.30	10.47	7.81
gly	6.02	5.62	5.32	5.21	5.51	4.66
ala	21.26	20.38	18.41	19.12	26.39	15.38
cyst	—	—	—	—	—	—
val	4.53	4.61	4.46	4.40	4.46	4.13
méth.	—	—	—	0.28	+	0.09
isoleu	2.02	2.36	2.56	2.42	0.96	3.18
leu	4.80	4.33	4.65	4.71	4.50	4.28
tyr	0.40	0.82	0.43	1.16	0.16	1.30
ala	0.62	0.62	0.57	0.74	0.43	0.51
lys/arg	4.74	3.39	3.29	3.30	14.57	2.30
bas/ac.	4.87	5.01	5.45	5.37	6.44	7.09

centage de l'histidine dans la fraction "F<sub>1</sub>" brute (on sait que F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub> est exempte d'histidine alors que F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub> en contient 1,4%). On a ainsi une proportion d'histone F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub> de 40% à 3 jours, de 60 et de 72%, à 10 et à 21 jours.

Ce résultat est confirmé par les électrophorèses des

histones "F<sub>1</sub>". La figure 1 en donne les tracés densitométrés.

La bande de référence (extrême gauche) est la sérulalbumine, la bande la plus rapide (extrême droite), correspond à l'histone F<sub>1</sub>-cF<sub>3</sub>; les deux autres à l'histone F<sub>1</sub>-cF<sub>1</sub>. En intégrant la surface des pics

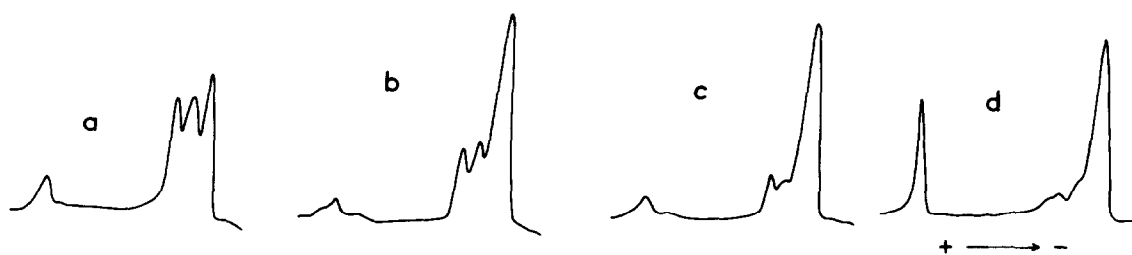


Fig. 1. Electrophorèse en gels de polyacrylamide des histones "F<sub>1</sub>" d'érythrocytes: (a) de poussins de 3 jours P 392 F<sub>1</sub>; (b) de poussins de 10 jours P 397 F<sub>1</sub>; (c) de poussins de 21 jours P 393 F<sub>1</sub>; (d) de poulet adulte P 390 F<sub>1</sub> (migration plus rapide que les 3 autres essais effectués parallèlement). La concentration des gels en polyacrylamide est de 17%. Après 4 heures de préélectrophorèse, les histones sont chargées à raison de 10 à 12 µg/20 µl. Après 4 h 30 d'électrophorèse en CH<sub>3</sub>COOH 0,6%, à 300 volts, les gels sont colorés à l'amido-schwarz 10 B, décolorés électrophorétiquement, puis densitométrés à l'aide d'un photomètre intégrateur enregistreur Vernon. (Mis à notre disposition par Monsieur le Professeur Vincendon, Centre de Neurochimie, Strasbourg, que nous remercions vivement.)

correspondants aux deux fractions, et compte tenu de la stoechiométrie de la réaction colorant-histone  $F_1$ -c $F_1$  et  $F_1$ -c $F_3$  dans le gel, on peut chiffrer à 10% près, la proportion de l'une et de l'autre fraction présente dans les différentes histones " $F_1$ ". On passe ainsi de 40% d'histone  $F_1$ -c $F_3$  dans l'histone " $F_1$ " du poussin de 3 jours, à 55% dans celle du poussin de 10 jours, puis à 70% à 21 jours et chez le poulet adulte.

La fraction  $F_1$ -c $F_1$  semble en régression en passant des figures 1a à 1d. Ce n'est qu'une apparence. En effet, en rapportant la quantité d'histone " $F_1$ " au DNA dosé simultanément dans les érythrocytes de poussins de 3, 10, et 21 jours, on passe de 14 à 19 puis à 23%; chez le poulet adulte, le rapport " $F_1$ "/DNA est de 22%. Tenant compte de ces valeurs, et des proportions relatives des deux fractions variant avec l'âge, on peut en conclure, qu'aux erreurs d'expériences près, le pourcentage d'histone  $F_1$ -c $F_1$ , exprimé en poids d'histone/DNA, est constant et de l'ordre de 8% à tous les âges étudiés. Par contre la fraction  $F_1$ -c $F_3$  passe de 6% à 10 puis à 16% dans les érythrocytes de poussins de 3 jours, 10 et 21 jours; elle se maintient ensuite à 15–16% chez le poulet adulte.

Nous avons montré précédemment que l'histone extraite par le TCA 5% représentait 20% de l'histone totale dans les noyaux d'érythrocytes de poulet adulte, la fraction  $F_1$ -c $F_3$  en constituant les 2/3 [2]. Chez le poussin, ce taux n'est atteint qu'après trois semaines environ. Or le sang du poussin contient plus de stades jeunes [5] de la lignée érythroïde que l'adulte,

où l'on ne trouve presque exclusivement que des érythrocytes mûrs. De même, la moelle osseuse où l'on a toutes les étapes de maturation des cellules sanguines, contiendrait peu d'histone spécifique [6] et après un traitement anémiant à la phénylhydrazine, elle n'en contiendrait plus [7]. Il se pourrait que la présence d'histone spécifique soit reliée directement au degré de maturation des cellules nucléées de la lignée rouge. C'est ce que nous nous proposons de vérifier dans la suite de nos travaux.

### Remerciements

Nous remercions Madame M. Kunstmann pour son excellente aide technique.

### Références

- [1] M. Champagne et A. Mazen, *Compt. Rend. Acad. Sci.* 265 (1967) 2100.
- [2] M. Champagne, A. Mazen et X. Wilhelm, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50 (1968) 1261.
- [3] E. W. Johns, *Biochem. J.* 104 (1967) 78.
- [4] E. W. Johns, D. M. P. Phillips, P. Simson et J. A. V. Butler, *Biochem. J.* 77 (1960) 631.
- [5] A. M. Lucas et C. Jamroz, *Atlas of Avian Hematology U.S.D.A. Monograph* 25 (1961) 157.
- [6] R. Purkayastha et J. M. Neelin, *Biochim. Biophys. Acta* 127 (1966) 468.
- [7] L. J. Edwards et L. S. Hnilica, *Experientia* 24 (1968) 228.