

## LIAISON ENTRE HISTONES ET RNA. ACTION DES PROTEINES ACIDES DE LA CHROMATINE SUR CETTE LIAISON

B.DASTUGUE, L.TICHONICKY, J.HANOUNE et J.KRUH

*Institut de Pathologie Moléculaire\**  
24, rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris 14e

Received 5 April 1970

Histone is able to associate with radioactive RNA to form a complex which is retained on a millipore filter; 500 µg of histone F<sub>1</sub> from bone marrow is able to combine with 100 µg of RNA. Chromatin acidic proteins reduce this association up to 50%. The binding between RNA and histone does not occur in the presence of urea and NaCl.

### 1. Introduction

L'existence de liaisons entre histones et DNA est bien établie; celle des protéines acides de la chromatine avec le DNA a également été mise en évidence [1, 2]. Les histones peuvent aussi se combiner aux protéines acides [3]. Lorsque les protéines acides se combinent aux histones, le pouvoir répresseur de ces dernières est diminué [1, 4]. Par ailleurs, nous avons montré que les histones inhibaient la synthèse de l'hémoglobine par un système acellulaire de réticulocytes en réagissant avec le RNA. L'hypothèse formulée était qu'il se formait une liaison histone-RNA, mais nous ne pouvions exclure formellement une activité ribonucléasique des histones [5]. Les protéines acides ajoutées au système acellulaire diminuent le pouvoir inhibiteur des histones [6].

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une liaison histone-RNA en utilisant du RNA radioactif et en isolant le complexe formé sur filtre millipore. Nous avons également montré qu'en présence de protéines acides, il y avait diminution de la fixation du RNA par les histones.

### 2. Méthodes

Les histones, fraction F<sub>1</sub> de moelle osseuse et de foie de lapin, ont été préparées selon la méthode de Johns [7] modifiée [5]. Les protéines acides de la chromatine et les fractions pH 5 et ribonucléoprotéines résiduelles (RNP-R) ont été préparées par la méthode de Wang [8] modifiée [6]. Pour obtenir le RNA radioactif on injecte à des rats 45 µCi d'acide orotique-5-H<sup>3</sup> (Activité spécifique 16 Ci/mmole) pour 100 g. Les animaux sont sacrifiés 22 h plus tard, les foies prélevés, le RNA est préparé à partir des noyaux par la méthode de Hiatt [9].

Dans une expérience on a fractionné le RNA par 16 h de centrifugation à 20 000 rpm dans un gradient linéaire de saccharose de concentration 5–20%.

Les incubations ont été réalisées de la manière suivante: La solution de RNA est incubée en présence d'histones et, dans certains cas, de protéines acides dans un tampon tris 0,01 M (pH 7,2) avec une concentration finale de MgCl<sub>2</sub> 4 mM pendant 1 h à 4° (les résultats sont identiques si l'on prolonge l'incubation pendant 24 h). Le volume d'incubation est de 0,7 ml. On filtre sur filtre millipore HA 0,45 µm. Le filtre est lavé, dissout dans 100 ml de la solution de Bray [10], et sa radioactivité mesurée dans un scintillateur Nuclear-Chicago.

\* Institut d'Université, Groupe U 15 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, laboratoire associé au Centre National de la Recherche Scientifique.

### 3. Résultats

1) On ajoute des quantités croissantes d'histone F<sub>1</sub> à 200 µg de RNA radioactif et on passe sur filtre millipore. La radioactivité retenue par le filtre est mesurée (fig. 1). Avec l'histone F<sub>1</sub> de moelle on observe une fixation linéaire jusqu'à 500 µg d'histone, puis la courbe tend à s'aplatir. Avec l'histone F<sub>1</sub> de foie la fixation est plus faible, elle est linéaire jusqu'à 1000 µg d'histone.

2) Lorsque l'on ajoute des quantités croissantes de RNA radioactif à 500 µg d'histone, on constate que l'on a un maximum de fixation, 110 µg lorsque l'on ajoute 300 µg de RNA (fig. 2). Cependant, quelque soit la quantité de RNA incubée on n'obtient qu'une combinaison partielle qui ne dépasse pas 63% du RNA. Ceci n'est pas dû au fait que seuls certains types de RNA se combinent, car la proportion de RNA combinée est sensiblement identique lorsqu'au lieu du RNA total on utilise 50 µg de RNA lourd, 28, 16, 9 ou

4 S. L'interprétation est soit qu'il existe un équilibre en RNA combiné et RNA libre, soit qu'un partie ne soit pas arrêté par le filtre.

3) Les protéines acides diminuent le pouvoir de combination aux histones (fig. 3). L'addition de 750 µg de protéines acides, fraction pH 5 ou RNP-R, à 500 µg d'histone et 200 µg de RNA réduit de 50% la quantité de RNA combinée aux histones.

4) L'addition d'urée 3,5 M ou de NaCl 1 M au mélange RNA et histone ne diminue que légèrement le pouvoir d'association, celui-ci est fortement réduit par la présence simultanée d'urée et de NaCl (tableau). Les liaisons sont donc à la fois du type électrovalence et hydrogène. L'action est parallèle lorsque l'on opère en présence de protéines acides et histones, il ne semble donc pas que l'on dissocie la liaison entre protéines acides et histones par ces composés.

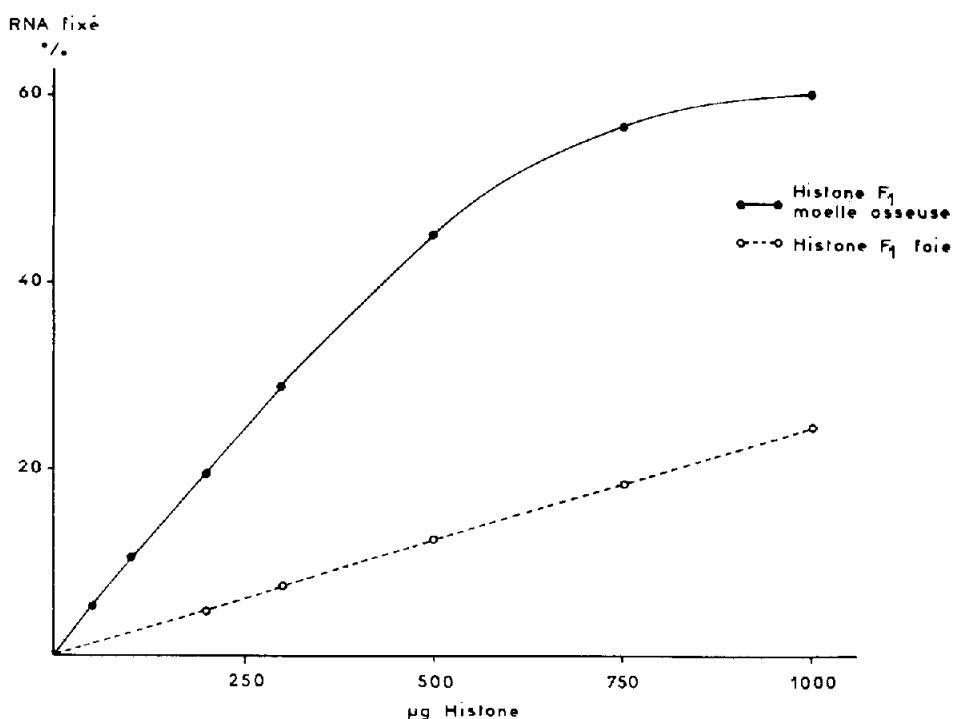


Fig. 1. Deux cents microgrammes de RNA ont été incubés avec des quantités croissantes d'histone pendant 1 h. Le complexe est filtré sur millipore et la radioactivité, retenue sur filtre, mesurée.

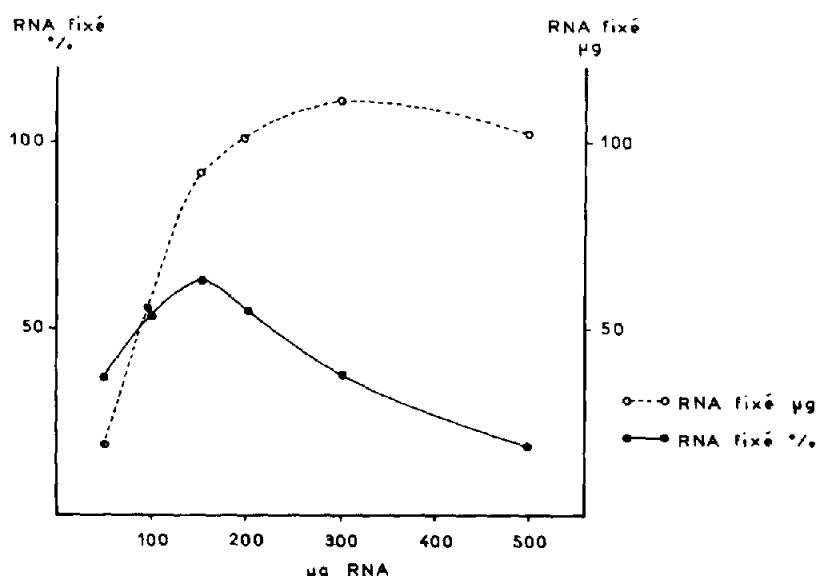


Fig. 2. Cinq cents microgrammes d'histone F<sub>1</sub> de moelle osseuse ont été incubés avec des quantités croissantes de RNA radioactif, filtrés sur millipore et la radioactivité du filtre mesurée. Les courbes indiquent d'une part la quantité de RNA retenue, d'autre part la proportion de RNA retenue par rapport à la quantité ajoutée au milieu.

Fig. 3. L'incubation comprend 500 μg d'histone F<sub>1</sub> de moelle osseuse, 200 μg de RNA et des quantités croissantes de protéines acides de la chromatine. On mesure la radioactivité retenue sur filtre millipore. 100% représente la quantité retenue en absence de protéines acides, soit environ 50% du RNA total ajouté.

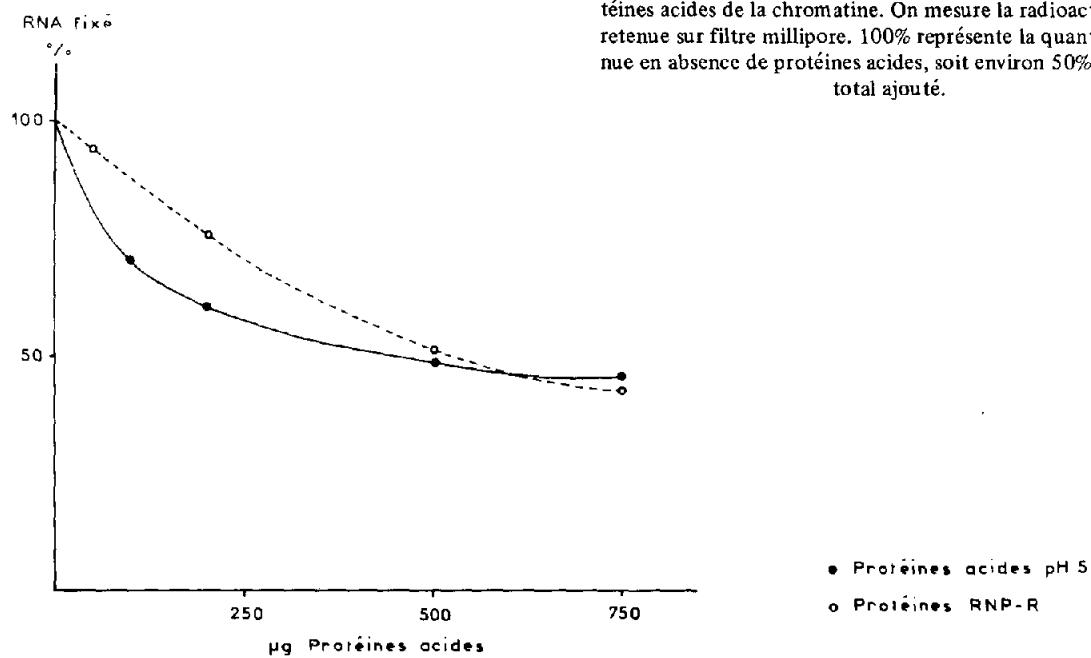


Tableau  
Action de l'urée et NaCl sur les liaisons entre RNA, histones  
et protéines acides.

Protéines nucléaires	Radioactivité cpm en présence de			
	0	Urée	NaCl	Urée + NaCl
Histones	3 255	2 707	2 140	374
Histones + Protéines acides	2 133	1 907	717	593

On incube 80 µg de RNA (soit 6 4000 cpm) avec 200 µg d'histone F<sub>1</sub> de moelle osseuse et dans certaines expériences de 200 µg de protéines acides pH 5, en présence d'urée 3,5 M, NaCl 1 M ou du mélange des deux.

#### 4. Discussion

Les observations faites avec le DNA et les protéines de la chromatine se retrouvent avec le RNA. Les histones se combinent aux RNA et les protéines acides empêchent partiellement cette liaison. Nous avons utilisé la fraction F<sub>1</sub> des histones car ce sont celles qui inhibent le plus fortement la synthèse acellulaire de l'hémoglobine, l'inhibition étant plus forte avec l'histone F<sub>1</sub> de moelle osseuse qu'avec la même fraction de foie. Il est donc possible que les protéines acides de la chromatine interviennent non seulement pour limiter la transcription dans les cellules différencierées, mais également pour limiter les RNA susceptibles d'être utilisés, en particulier les RNA messagers. Les proté-

ines acides qui sont hautement spécifiques du type cellulaire [11] diminuent cette intervention des histones et peuvent ainsi moduler le passage des RNA dans le cytoplasme.

#### Remerciements

Nous remercions l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, le Centre National de la Recherche Scientifique, la Délégation Générale à la Scientifique et Technique, le Commissariat à l'Energie Atomique et la Ligue Nationale Française contre le Cancer de l'aide apportée à ce travail.

#### Bibliographie

- [1] M.E.Balis, J.S.Salser et A.Elder, *Nature* 203 (1964) 1170.
- [2] J.A.V.Butler, *Nature* 207 (1965) 1041.
- [3] T.Y.Wang et E.W.Johns, *Arch. Biochem. Biophys.* 124 (1968) 176.
- [4] J.H.Freuster, V.G.Allfrey et A.E.Mirsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 50 (1963) 1026.
- [5] J.Kruh et D.Labie, *Biochim. Biophys. Acta* 161 (1968) 518.
- [6] J.Kruh, L.Tichonicky et H.Wajerman, *Biochim. Biophys. Acta* 195 (1969) 549.
- [7] E.W.Johns, *Biochem. J.* 92 (1964) 55.
- [8] T.Y.Wang, *J. Biol. Chem.* 127 (1968) 235.
- [9] H.H.Hiatt, *J. Mol. Biol.* 5 (1962) 217.
- [10] G.A.Bray, *Anal. Biochem.* 1 (1960) 279.
- [11] B.Dastugue, L.Tichonicky, J.Penit-Soria et J.Kruh, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, sous presse.