

Accessibilité des sites d'ubiquitination des histones H2A et H2B dans la chromatine

Un argument pour impliquer l'ubiquitine dans la décondensation de la structure

Marie-Françoise Hacques, Christian Marion

Il apparaît maintenant que l'ubiquitine est impliquée dans un grand nombre de processus cellulaires. L'une de ses fonctions pourrait intéresser la régulation fonctionnelle des protéines acceptrices, comme le suggère la présence dans la chromatine d'histones H2A et H2B transitoirement ubiquitinées. Lors de la modification de ces histones, il y a formation d'une liaison iso-peptidique entre l'extrémité C-terminale de la glycine 76 de l'ubiquitine et le groupe $-NH_2$ de la lysine 119 pour H2A ou 120 pour H2B. Cette modification post-traductionnelle est réversible et des arguments expérimentaux importants permettent de la corréler à un état décondensé de la chromatine, intervenant soit au cours de la transcription, soit lors de la phase post-mitotique [1]. Il est donc raisonnable de supposer que l'ubiquitination de l'extrémité C-terminale des histones H2A et H2B modifie directement la conformation de la chromatine. La découverte du produit d'un gène de levure nécessaire pour la réparation de l'ADN, et capable de transférer l'ubiquitine sur l'histone H2B, a récemment renforcé et étendu cette hypothèse [2]. Cependant, il restait d'une part à apporter les preuves définitives de l'accessibilité des sites de modification de H2A et surtout de H2B à la surface de la chromatine, et d'autre part à attribuer un rôle structural direct aux régions C-terminales de ces deux protéines. Récemment, l'utilisation de protéases immobilisées sur support solide, qui présentent de nom-

breux avantages (absence de tout contaminant, contrôle de la réaction, stabilité accrue...), a permis d'obtenir des informations concernant la topographie des protéines dans les complexes nucléo-protéiques [3, 4]. Les échantillons de chromatine protéolysés ont été étudiés à l'aide de la technique de biréfringence électrique, qui permet de détecter de très subtils changements structuraux [5]. De plus, nous avons mis en œuvre des techniques immunochimiques utilisant des anticorps anti-histones et anti-peptides synthétiques de ces histones pour détecter de façon spécifique et extrêmement sensible le départ de certains fragments protéiques [6]. Par exemple, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie N-terminale de l'une des histones permet de révéler non seulement la présence de l'histone intact mais encore celle des polypeptides obtenus après dégradation de la partie C-terminale de l'histone. La stratégie que nous avons utilisée consiste donc à corréler les modifications conformationnelles observées après protéolyse ménagée à l'aide de la subtilisine immobilisée, au départ des fragments d'histones révélés par des anticorps spécifiques. Cette approche permet de montrer que les extrémités C-terminale de H1, N-terminale de H3 et C-terminales de H2A et H2B, sont protéolysées dès le début de la digestion. Ces régions sont donc très accessibles à la surface de la chromatine et leur clivage provoque une décondensation de la chromatine, comme le montre l'aug-

mentation de l'amplitude de la biréfringence spécifique et du temps de relaxation d'orientation. Cette décondensation correspond à un allongement des chaînes de l'ordre de 15 %, sans réorientation des nucléosomes ni modification des interactions ADN-protéine. Ensuite, les parties N-terminale de H1, C-terminale de H3 et N-terminales de H2A et de H2B sont clivées (*figure 1*), ce qui entraîne l'apparition de points de flexibilité entre les nucléosomes. La poursuite de la protéolyse conduit à un dépliement progressif de la structure, avec l'apparition de fragments d'ADN nus. Nos résultats montrent donc que la protéolyse des extrémités C-terminales des histones H2A et H2B entraîne la rupture d'interactions protéine-protéine, qui participaient au maintien de la chromatine dans un état condensé. De la même manière, ces interactions pourraient être modifiées par l'ubiquitination de H2A et de H2B, et conduire à l'ouverture de la structure chromatienne durant la réplication de l'ADN, le réarrangement des gènes ou la transcription. Cependant, une hypothèse séduisante serait que cette modification des histones permette l'accessibilité des enzymes de réparation aux lésions de l'ADN [7, 8]. Ainsi, la présence dans certaines maladies auto-immunes, comme le LED, d'auto-anticorps dirigés contre l'ubiquitine et contre des histones ubiquitinées [9] pourrait être expliquée par une augmentation locale d'ubiquitine quand les systèmes de réparation sont sollicités ■

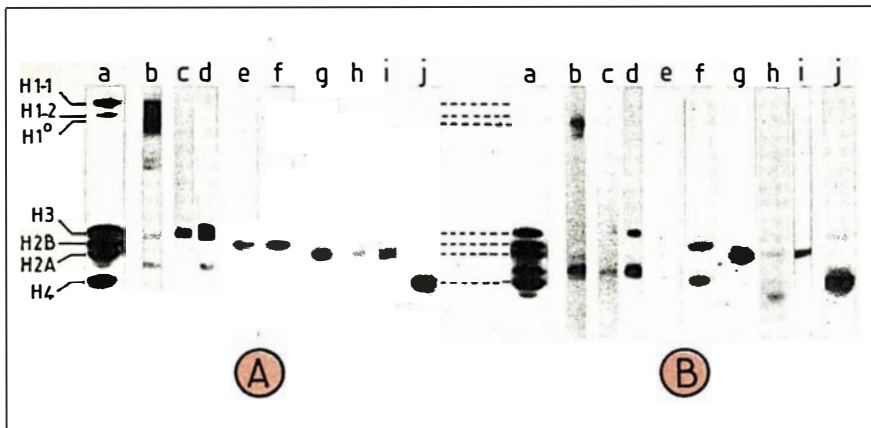


Figure 1. **Étude immuno-chimique de la chromatine de foie de rat digérée par la subtilisine immobilisée.** 7 μ g de protéines nucléaires extraites de la chromatine native (A) ou d'un échantillon protéolysé pendant 5 minutes par la subtilisine immobilisée (B) sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 16 % en présence de SDS. Les histones natives et les polypeptides issus de leur dégradation sont colorés au bleu de Coomassie (a) ou transférés sur feuille de nitrocellulose (b-j), puis révélés par des anti-sérums spécifiques dirigés contre : la partie globulaire de H1 (b); le peptide 1-21 de H3 (c); le peptide 130-135 de H3 (d); le peptide 1-25 de H2B (e); le peptide 110-125 de H2B (f); l'histone H2A (g); le peptide 12-26 de H2A (h); le peptide 116-129 de H2A (i); l'histone H4 (j). La réaction antigène-anticorps est révélée par le complexe 125 I-protéine A, suivie d'une autoradiographie à -70°C .

RÉFÉRENCES

- Hershko A. Ubiquitin-mediated protein degradation. *J Biol Chem* 1988; 263 : 15237-40.
- Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A. The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 1987; 329 : 131-4.
- Marion C, Roux B, Pallotta L, Coulet Pr. Study of chromatin organization with trypsin immobilized on collagen membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 114 : 1169-75.
- Marion MJ, Marion C. Localization of ribosomal proteins on the surface of mammalian 60S ribosomal subunits by means of immobilized enzymes. Correlation with chemical cross-linking data. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149 : 1077-83.
- Marion C, Martinage A, Tirard A, et al. Histone phosphorylation in native chromatin induces local structural changes as probed by electric birefringence. *J Mol Biol* 1985; 186 : 367-79.
- Muller S, Van Regenmortel MHV. Use of anti-histone antibodies with nucleosomes. *Methods Enzymol* 1989; 170 (sous presse).
- Sedgwick S, Johnston L. Ubiquitous cycles of repair. *Nature* 1987; 329 : 109.
- Kahn A. Ubiquitine, cycle cellulaire et réparation de l'ADN. *médecine/sciences* 1988; 4 : 59.
- Muller S, Briand JP, Van Regenmortel MHV. Presence of antibodies to ubiquitin during the autoimmune response associated with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 8176-80.

m/s n° 4 vol. 5, avril 89

Summary

Accessibility of ubiquitination sites of histones H2A and H2B in chromatin. An argument for the involvement of ubiquitin in chromatin decondensation

The accessibility of the C-terminal parts of histones H2A and H2B, where the sites of ubiquitination are located, has been proved by digesting chromatin with immobilized subtilisin. Their proteolysis is accompanied by chromatin decondensation, due to the modification of protein-protein interactions. In the same way, histone ubiquitination could modify such contacts and participate in chromatin expansion.

Remerciements

Nous remercions S. Muller pour son aide et ses conseils.

ADRESSE

M.-F. Hacques, C. Marion. Laboratoire de physico-chimie biologique, LBTM, Cnrs UMR 9. 43, boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

TIRÉS A PART

M.-F. Hacques.