

## ETUDE COMPARATIVE DE DEUX FORMES MOLECULAIRES DE LA NUCLEASE DE *staphylococcus aureus*

Naziha MARRAKCHI - M'ZID (1) et PATRICK COZZONE (2)

### Résumé

En utilisant des techniques analytiques variées et complémentaires, nous avons caractérisé biochimiquement deux formes moléculaires de la nucléase de *Staphylococcus aureus* (souche Foggi). Les résultats obtenus montrent clairement que la nucléase I diffère de la nucléase II par la perte d'un dipeptide du côté N - Terminal. Cette perte ne semble pas affecter l'activité enzymatique puisque les deux formes possèdent les mêmes activités spécifiques vis à vis de l'ADN et de l'ARN. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour rendre compte de l'ensemble des résultats.

### I. INTRODUCTION

La nucléase de *Staphylococcus aureus* a été mise en évidence par CUNNHINGAM et coll. en 1956 à partir d'une culture de souche pathogène appelée Foggi. Cette enzyme est formée d'une simple chaîne polypeptidique dont la structure a été élucidée par ANFINSEN M. et coll. (1968, 1971).

Du point de vue moléculaire, on note l'absence de cystéine. L'enchaînement polypeptidique de 149 acides aminés n'est donc réticulé par aucun point disulfure (ANFINSEN, 1963).

Du point de vue spécificité, la nucléase de *Staphylococcus aureus* est une phosphodiesterase qui hydrolyse soit le DNA soit le RNA en libérant des 3' phosphanonucléotides.

La présence de Ca dans le milieu réactionnel est nécessaire pour l'activité nucléasique.

Pour purifier cette enzyme les techniques chromatographiques utilisées par MARAVEK et coll. (1969) ont toujours abouti à la mise en évidence d'un seul pic d'activité nucléasique chez *Staphylococcus aureus* (souche Foggi).

Cependant, et dans des conditions expérimentales légèrement différentes (vitesse d'élution plus lente et poudre de phosphocellulose plus homogène), deux pics d'activité nucléasique ont été détectés lors de la chromatographie finale sur phosphocellulose (COZZONE, 1980). Cette observation est parfaitement reproductible.

Dans ce travail on se propose donc, de savoir si la nucléase décrite par ANFINSEN et coll. figure parmi les deux fractions à activité nucléasique observées. Dans l'hypothèse d'une réponse positive, on essaiera de préciser les bases moléculaires de ce dimorphisme enzymatique et notamment :

- s'il s'agit de deux enzymes génétiquement indépendants
- s'il s'agit de deux formes moléculaires dont l'une dérive de l'autre par modification chimique ou coupure enzymatique.

Pour répondre à ces questions, nous avons purifié les deux formes moléculaires de la nucléase de *Staphylococcus aureus*, caractérisé leurs paramètres moléculaires et enfin mesuré leurs activités nucléasiques respectives vis à vis du DNA et du RNA.

---

(1) Faculté des Sciences - Campus universitaire - Tunis.

(2) Institut de Chimie Biologique - Université de Provence - Centre Saint Charles - Marseille.

## II. MATERIEL ET METHODES

### a) Matériel biologique

La nucléase est préparée à partir d'une culture de souche Foggi de *Staphylococcus aureus*.

### b) Technique

#### 1°) Extraction et purification

L'extraction et la purification ont été faites selon le protocole expérimental décrit par FUSCH et coll. 1967. Ce protocole comporte essentiellement les techniques suivantes :

- Chromatographie sur phosphocellulose : l'enzyme est purifiée après deux passages sur chromatographie de phosphocellulose utilisant un gradient linéaire d'acétate d'ammonium (0,3 M pH 5,7 — 1 M pH 8).

- Electrophorèse : Pour contrôler la purification nous avons utilisé la technique d'électrophèse sur gel de polyacrylamide modifiée par ORNTEIN et DAVIS (1964), à une concentration de 7,5% et à un pH acide (pH = 4,5).

- Electrofocalisation : utilisée dans le but de déterminer d'une part le point isoélectrique et d'autre part pour mieux séparer les protéines mal résolues après électrophorèse, l'électrofocalisation est faite sur gel de polyacrylamide à 3,5%. Le gradient de pH est établi entre 3,5 et 10,5 pour un mélange d'ampholines approprié migrant au même endroit après électrophorèse, l'électrofocalisation est faite sur gel de polyacrylamide à 3,5%. Le gradient de pH est établi entre 3,5 et 10,5 par les ampholines.

#### 2°) Détermination de la composition globale en acides aminés

Les protéines sont soumises à une hydrolyse acide par HCl 6N. La réaction est faite sous vide à la température de 110°C. Les temps de réaction sont respectivement de 24H., 48H et 72H. Les fractions relatives des différents acides aminés sont déterminées dans un autoanalyseur Biotronik selon la technique de SPACKMAN, STEIN et MOORE (1958).

#### 3°) Identification des résidus N et C terminaux

- L'identification des résidus N terminaux a été faite selon la méthode décrite par GROS et LABOUESSE (1967).

Les dérivés dansys aminoacide (N terminaux) sont identifiés par chromatographie sur couche mince sur des plaques de silicagel.

- L'identification des résidus C terminaux est faite selon la technique décrite par BROWN (1967) utilisant la carboxypeptidase A. La réaction est faite à 37°C utilisant une concentration en carboxypeptidase par rapport au substrat protéique égale à 1/20. Les acides aminés libérés sont déterminés en fonction du temps de la réaction en utilisant l'auto-analyseur.

#### 4°) Mesure de l'activité nucléasique

Utilisant comme substrat soit le DNA dénaturé soit le RNA dans un tampon tris-HCl contenant 10,2 m M de Ca Cl<sub>2</sub>, l'activité enzymatique est suivie par dosage spectrophotométrique de l'effet hyperchrome à 260 m. ANFINSEN (1963).

### III. RESULTAT ET DISCUSSION

Comme nous l'avons déjà signalé, la figure n° 1 montre les deux pics d'activité nucléasique obtenus après purification sur une colonne de phosphocellulose. Ils sont élués respectivement aux pH 6,43 et 6,70.

Nous appelons les activités représentées au niveau de ces pics : Nucléase I (pic I) et Nucléase II (pic II). Les fractions correspondant à chacun de ces pics sont rassemblées, lyophilisées et soumises à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7,5%). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n° 2. Ils montrent :

- Une pureté au moins équivalente à 90% pour les deux nucléases
- Une migration différente, relativement plus rapide pour la Nucléase II permettant une séparation nette des deux nucléases.

Il semble donc que nous sommes en présence de deux formes moléculaires ayant des points isoelectriques différents.

#### Electrofocalisation

Cette technique nettement plus fine que l'électrophorèse, a été utilisée pour analyser les deux formes moléculaires et déterminer leurs points isoelectriques. Les résultats présentés dans la figure n° 3 montrent une simple bande pour la nucléase II et deux bandes d'intensité égale et bien séparées pour la nucléase I (Nucléase Ia et Nucléase Ib). Les points isoelectriques correspondant sont les suivants :

- . Nucléase II : 9,1
- . Nucléase Ia : 8,75
- . Nucléase Ib : 9

Les deux bandes obtenues pour la Nucléase I pourraient s'expliquer par une isomérisation chimique ou conformationnelle intervenue au cours de l'électrofocalisation. Quoi qu'il en soit, il est clair que la Nucléase II est plus basique que les deux formes de la Nucléase I.

Deux hypothèses au moins peuvent rendre compte de ces résultats :

- soit que la nucléase I dérive de la nucléase II par une désamidation donc une acidification.
- soit que les deux nucléases I et II sont contrôlées par deux gènes différents.

Ces deux hypothèses ne s'excluent pas mutuellement.

#### Composition globale en acides aminés et détermination des résidus N et C terminaux

Dans le but de trancher entre les deux hypothèses proposées, nous avons essayé de comparer globalement les deux séquences.

- Résidus N - terminaux : Utilisant la technique classique de dansylation suivie d'une hydrolyse acide et résolution sur plaque chromatographique de silicagel nous avons obtenu les empreintes présentées dans la figure n° 4. Nous pouvons conclure que le résidu N - terminal de la nucléase II correspond à l'alanine. Quant à la nucléase I, nous observons à côté des traces d'alanine une tâche importante de thréonine ou de serine. La chromatographie à trois dimensions (figure 4) nous a permis de montrer que c'est la sérine qui correspond aux résidus N terminal de cette nucléase.

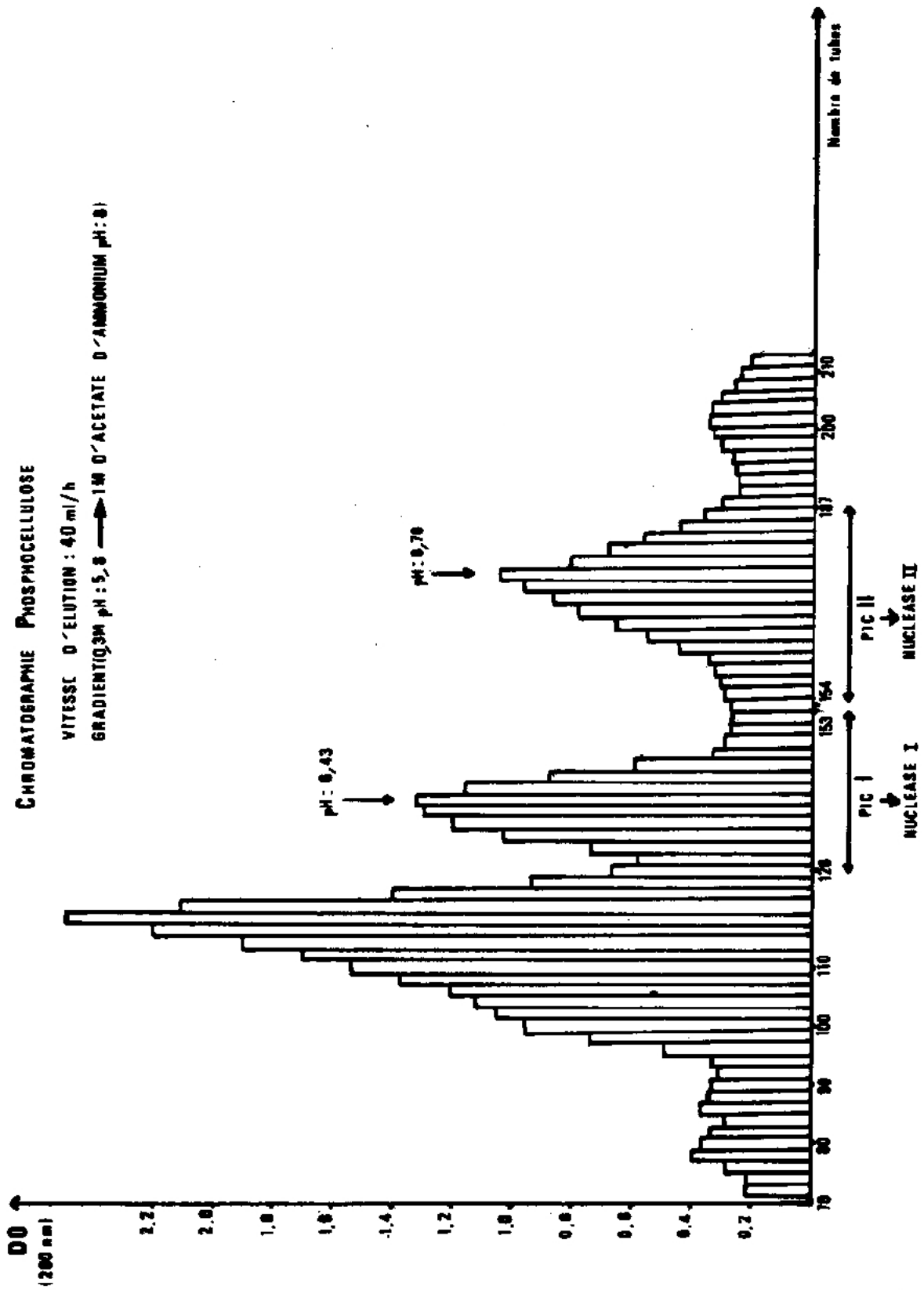


FIG.1 DENSITE OPTIQUE EN FONCTION DES FRACTIONS D'ELUTION

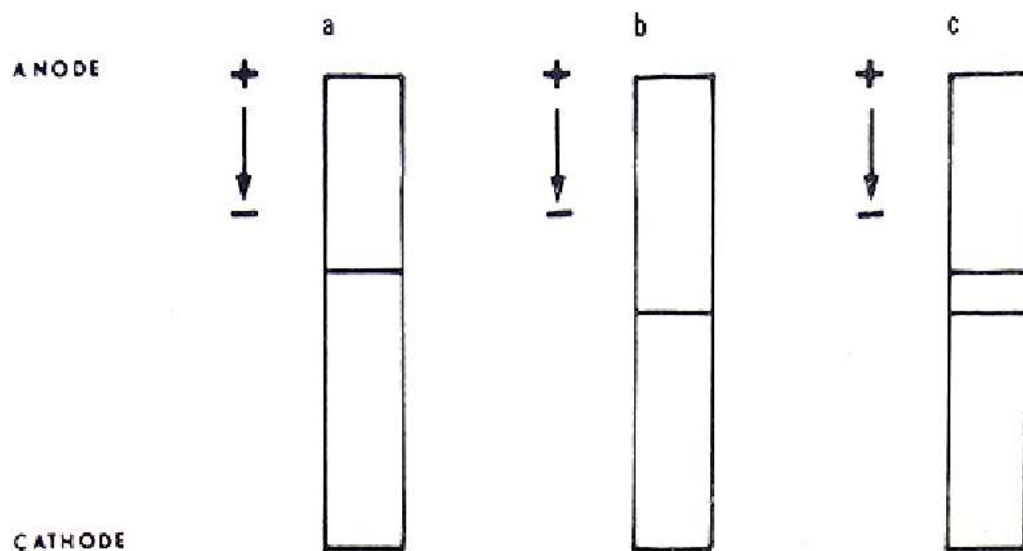


FIG. 9. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE 7,5 %

- a NUCLEASE I
- b NUCLEASE I
- c NUCLEASE I + NUCLEASE II

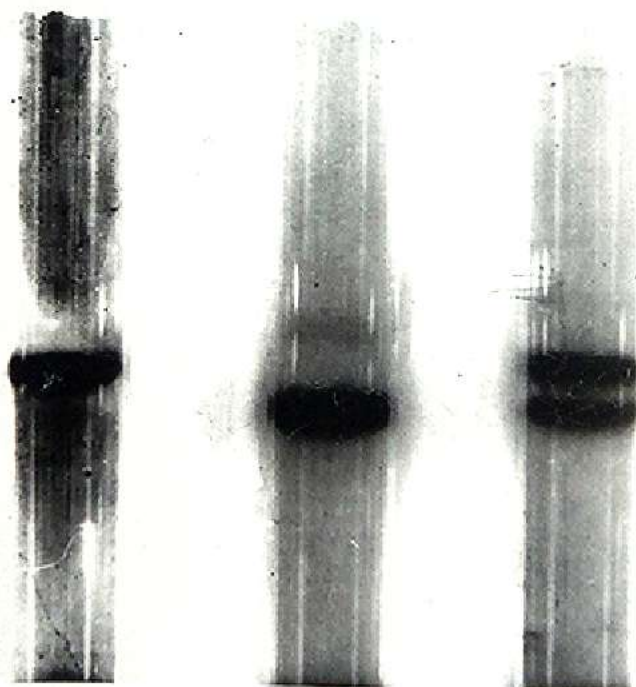


PHOTO N° 1 MONTRANT LA DIFFERANCE DE MIGRATION DES DEUX FORMES DE NUCLEASES

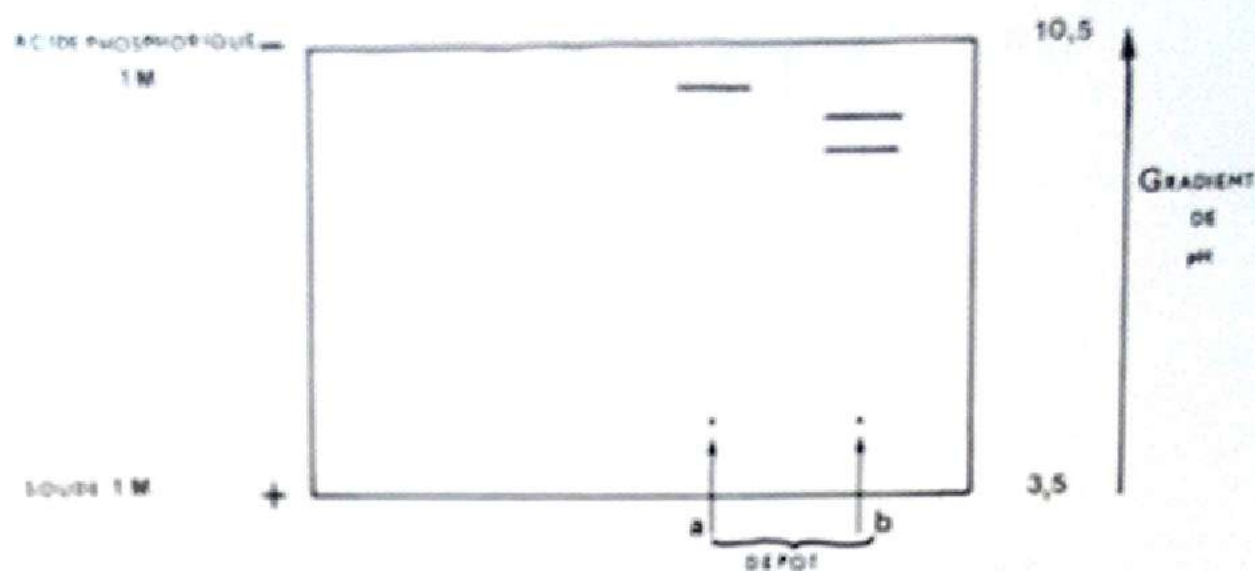


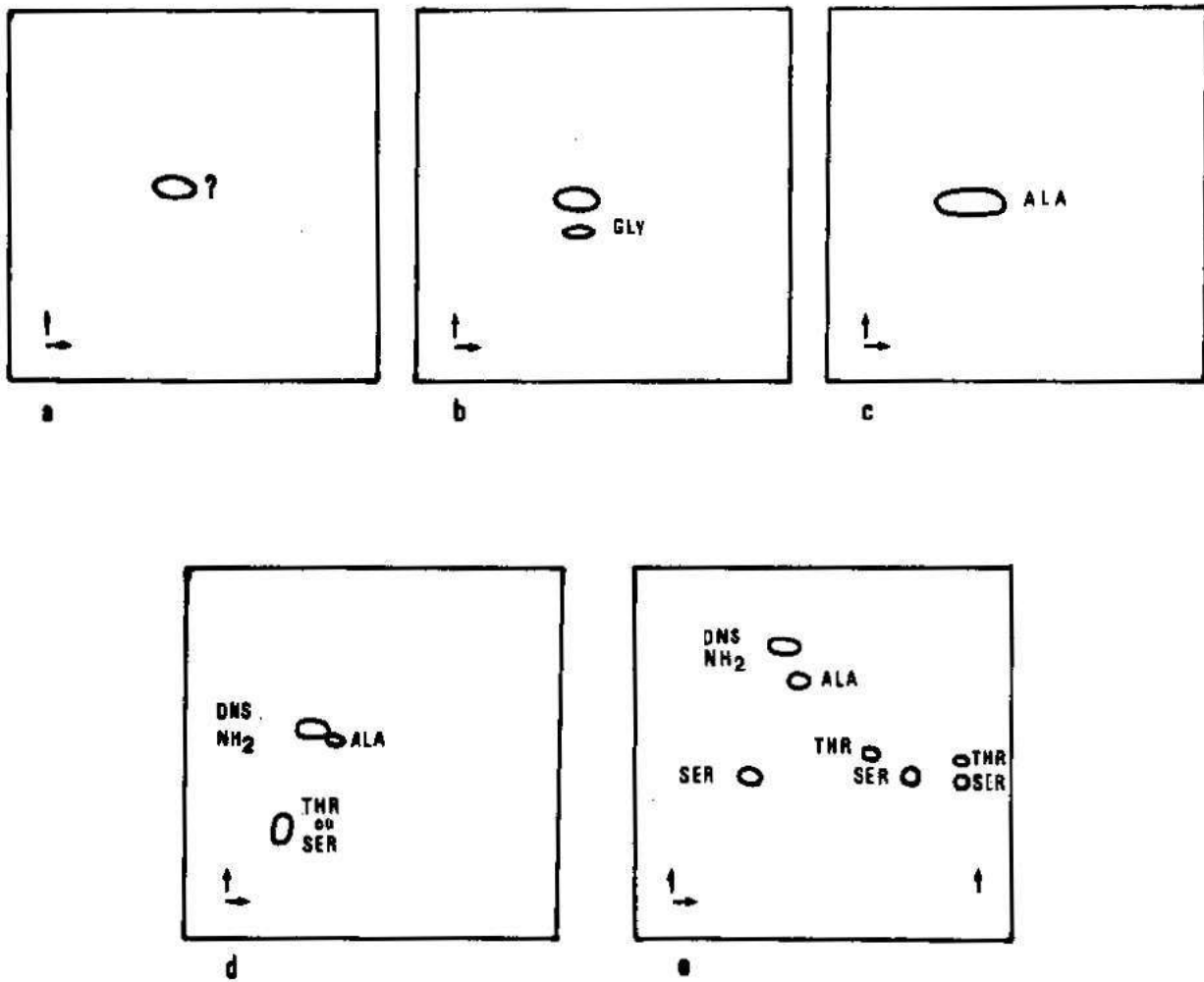
FIG 3 ELECTROFOCALISATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE 3,5 %

a NUCLEASE II

b NUCLEASE I



PHOTO B12 RESULTAT DE L'ANALYSE DES DEUX FORMES DE NUCLEASES PAR ELECTROFOCALISATION



**FIG 4 CHROMATOGRAPHIES SUR PLAQUE DE SILICE DE L'HYDROLYSAT DES NUCLEASES I ET II PREALABLEMENT TRAITÉES PAR LE DNS**

- a** NUCLEASE II
- b** NUCLEASE I + GLY
- c** NUCLEASE II + ALA
- d** NUCLEASE I
- e** NUCLEASE I + THR + SER

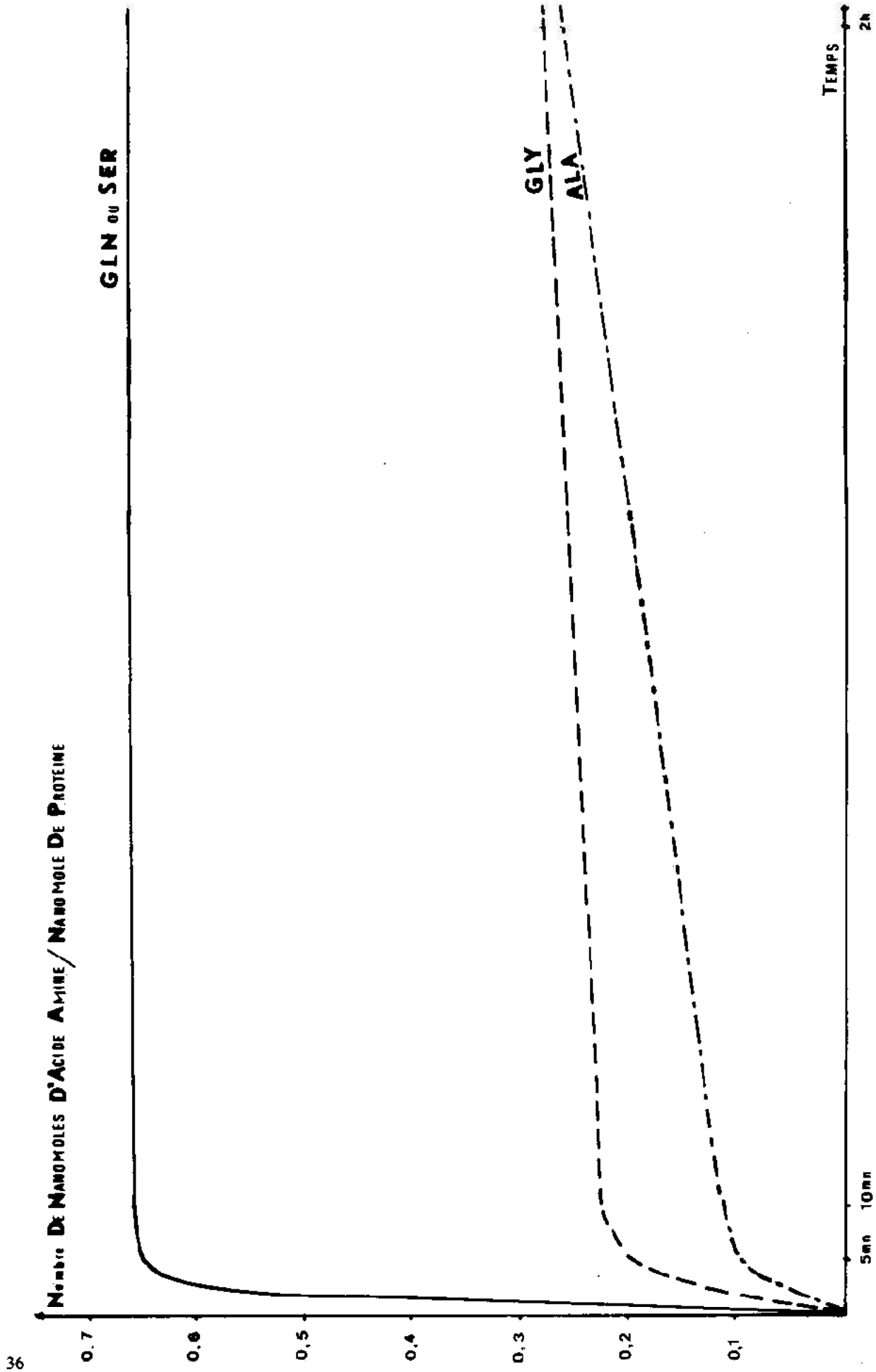


FIG 5 ACTION DE LA CARBOXYPEPTIDASE A SUR LA NUCLEASE I



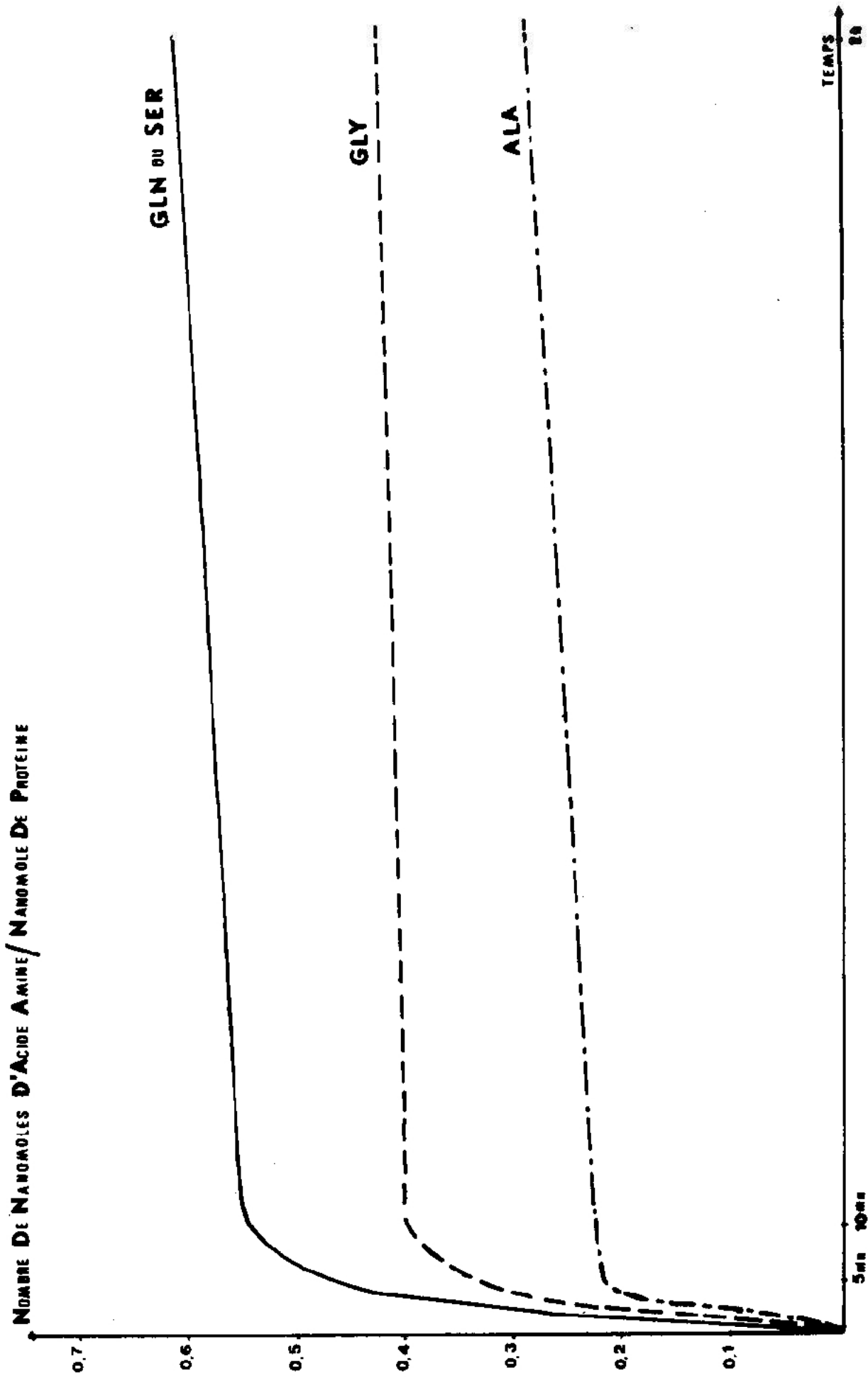


FIG 6 ACTION DE L $\alpha$  CARBOXYPEPTIDASE A SUR LA NUCLEASE II

ACIDES AMINES	NUCLEASE I		NUCLEASE II		COMPOSITION CALCULEE D'APRES LA SEQUENCE (ANFINSEN-1968)
	RESULTATS EXPERIMENTAUX	PLUS PROCHE ENTIER	RESULTATS EXPERIMENTAUX	PLUS PROCHE ENTIER	
ASX	14,3	14	13,8	14	14
THR	8,9	9	10,2	10	10
SER	5,3	5	4,7	5	5
GLX	18,2	18	18,1	18	18
PRO	5,7	6	5,6	6	6
GLY	10,4	10	10,1	10	10
ALA	12,7	13	14,3	14	14
VAL	8,9	9	8,9	9	9
CYS	0	0	0	0	0
MET	3,6	4	3,6	4	4
ILE	5,1	5	5,0	5	5
LEU	10,9	11	11,2	11	11
TYR	7,4	7	7,0	7	7
PHE	3,0	3	3	3	3
LYS	20,7	21	20,8	21	23
HIS	4	4	4	4	4
ARG	4,8	5	5,1	5	5

Tableau 1 : Composition Globale En Acides Aminés Des Deux Nucleases De S. Aureus

- Résidus C - terminaux : les résultats obtenus en soumettant les deux types de nucléase à la digestion enzymatique par la carboxypeptidase A (figure 5 et 6) montrent que le résidu C - terminal pourrait être dans les deux cas soit la glutamine soit la sérine. En outre, et aussi bien pour la nucléase I que pour la nucléase II le résidu C - terminal est précédé par l'alanine et la glycine.

- Composition globale en acides aminés, le tableau n° 1 donne les proportions relatives des différents résidus constitutifs des deux formes de la nucléase.

Les données présentées dans ce tableau montrent qu'à l'exception des résidus de thréonine et alanine, la nucléase I et II ne présentent aucune différence significative. La forme I se distingue de la forme II par une thréonine et une alanine en moins. Comme nous l'avons déjà noté, ANFINSEN et coll. (1967) ont toujours obtenu un seul pic d'activité nucléasique à partir de la souche Foggi de *Staphylococcus aureus*, ce pic correspond à une seule forme moléculaire. La séquence des extrémités N et C terminales de cette molécule est la suivante ANFINSEN, (1968) :



Tenant compte de cette séquence et des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons tirer les deux conclusions suivantes :

- La nucléase II correspond à celle mise en évidence et analysée par ANFINSEN et son groupe (1968).

- La nucléase I pourrait correspondre à une forme dégradée de la nucléase II avec perte d'un dipeptide ( $H_3 N Ala - Thr -$ ) du côté N-terminal. Cette interprétation rend compte d'une part de la composition globale en acides aminés de la nucléase I (une alanine et une thréonine en moins) et d'autre part de la sérine comme acide aminé N-terminal de cette nucléase.

Cette dégradation ne semble pas affecter l'activité enzymatique. En effet comme le montre les tableaux n° 2 et n° 3, l'activité spécifique déterminée pour les deux formes moléculaires utilisant comme substrat l'ADN ou l'ARN ne montre aucune différence appréciable entre les deux nucléases.

Ces résultats indiquent en outre que l'activité spécifique déterminée pour l'ADN est au moins quatre fois plus importante que celle mesurée pour l'ARN.

#### IV. CONCLUSION GENERALE

Dans ce travail nous nous sommes proposés de comparer deux formes moléculaires de la nucléase de *Staphylococcus aureus* en nous adressant à des techniques analytiques variées et complémentaires. Toutes les données expérimentales obtenues montrent clairement que la nucléase I dérive de la nucléase II par perte d'un dipeptide du côté N-terminal.

Plusieurs questions restent cependant encore posées et pour lesquelles nous n'avons pas encore de réponse définitive :

- Pourquoi les deux nucléases ne manifestent-elles pas mêmes points isoélectriques et pourquoi la nucléase I présente-t-elle deux points isoélectriques différents ? Plusieurs hypothèses qui restent à vérifier ont été avancées.

E = NUCLEASE I (C = 4 $\mu$ L)			
S = ADN (C = 80 $\mu$ L)			
VOLUME D'ENZYME AJOUTE EN $\mu$ L	DENSITE OPTIQUE / MINUTE	ACTIVITE SPECIFIQUE	
5	0,031	1795	1575
10	0,08	2030	2000
15	0,121	2390	2015
20	0,155	1955	1935
ACTIVITE SPECIFIQUE MOYENNE = 1882			

E = NUCLEASE II (C = 3,5 $\mu$ L)			
S = ADN (C = 50 $\mu$ L)			
VOLUME D'ENZYME AJOUTE EN $\mu$ L	DENSITE OPTIQUE / MINUTE	ACTIVITE SPECIFIQUE	
5	0,0355	1795	
10	0,079	2030	
15	0,14	2390	
20	0,152	1955	
ACTIVITE SPECIFIQUE MOYENNE = 1997,5			

TABLEAU N = 2 ACTIVITE DESOXYRIBONUCLEASIQUE DES NUCLEASES I ET II

<b>E = NUCLEASE I</b> <b>S = ARN</b>		<b>E = NUCLEASE II</b> <b>S = ARN</b>		<b>E = NUCLEASE III</b> <b>S = ARN</b>	
<b>C = 3,9 µg/ml</b> <b>C = 80 µg/ml</b>		<b>C = 4 µg/ml</b> <b>C = 80 µg/ml</b>			
<b>VOLUME EN µL D'ENZYME AJOUTE</b>	<b>DO / MIN</b>	<b>ACTIVITE SPECIFIQUE</b>	<b>VOLUME EN µL D'ENZYME AJOUTE</b>	<b>DO / MINUTE</b>	<b>ACTIVITE SPECIFIQUE</b>
5	0,012	609,5	5	0,0115	575
10	0,02	512	10	0,0235	580
15	0,027	500	15	0,0335	557,5
20	0,042	538	20	0,041	520
<b>ACTIVITE SPECIFIQUE MOYENNE = 540</b>			<b>ACTIVITE SPECIFIQUE MOYENNE = 558</b>		

**TABIEAU I** ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE DES NUCLEASE I ET II

Il est vraisemblable que le contenu en amide de la forme II soit plus élevé que celui de la forme I. De plus des isomérisations partielles et artéfactuelles des protéines en cours d'électrofocalisation ont déjà été décrites (Hémoglobines) et pouvaient rendre compte des deux bandes observées pour la nucléase I.

- Pourquoi la perte du dipeptide engendrant la nucléase I n'altère-t-elle pas l'activité spécifique de l'enzyme déterminée par l'étude de la cinétique d'hydrolyse des acides nucléiques ?

Il est évident que la perte du dipeptide N-terminal ne modifie pas la conformation active de l'enzyme. En fait les travaux de COTTON (1979) ont clairement montré que ce dipeptide Ala<sub>1</sub> - Thr<sub>2</sub> ne fait ni partie du site actif ni ne contribue au maintien de la cohésion tridimensionnelle du site catalytique.

On peut donc conclure que les deux formes moléculaires I et II de la nucléase de *Staphylococcus aureus* sont très voisines. La forme I dérive de la forme II par une protéolyse du dipeptide N-terminal accompagnée vraisemblablement d'une désamidation partielle.

Il faut enfin noter que nos résultats ne nous permettent pas encore de savoir si cette dégradation est due à des artéfacts de préparation ou si elle se produit dans la cellule.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ANFENSEN, C. B., RUNELAY, M. K. and TANIUCHI, H. (1963) : Acta. Chem. Scand. 17:5270,5277
- BROWN, J.L., KOORA DJIAN, S. and ZABINI, (1967) : J. Biol. Chem. 242, 4259 - 4266
- COTTON, F.A., HAZW, E.E. JR and LEGG, M.G. (1979) : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 76, 2551-2555
- COZZONE P. (1980) : Communication personnelle.
- CUSIMANO, C.L., TANUCHI H., and ANFENSEN, C.B. (1968) : J. Biol. Chem. 243, 4769 - 4778.
- FUCHS, S., CUATRECASAS, P. and ANFENSEN, C.B. (1967) :
- HAYES, M.B. and WERLNER, D. (1969) : J. Biol. Chem. 244, 6636 - 6642.
- MARAVEK, L., ANFENSEN, C.B., CONE, J.L. and TANIUCHI, H. (1969) : J. Biol. Chem. 244, N° 2 497-499.
- ORNSTEIN, L. and DAVIS, B. J. (1964) : Ann. Ny. Acad. Sci. 121, 312 - 342.
- SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. and MOORE S. (1958) : Anal Chem. 30, 1190 - 1198.