

Étude de la dénaturation de la β -galactosidase induite par l'urée à l'aide de modèles mathématiques sous R

Eason Gregoire-Mazzocco¹, Koffi Atchotin¹

1. Faculté Sciences et Sciences de l'Ingénieur, Université Bretagne sud, Centre d'enseignement et de recherche Yves Coppens

I. Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions biochimiques au sein des organismes vivants en abaissant l'énergie d'activation des réactions sans être consommées au cours du processus [3]. En raison de leur efficacité et de leur spécificité, les enzymes sont également largement exploitées dans le domaine industriel pour catalyser un grand nombre de procédés d'importance commerciale [3].

La β -galactosidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des galactosides, notamment le lactose, dans les organismes vivants. Cet enzyme présente également un intérêt industriel majeur [4]. Elle est notamment utilisée pour l'élimination du lactose dans les produits laitiers destinés aux personnes intolérantes au lactose, ainsi que pour la production de composés galactosylés à forte valeur ajoutée [1].

La cinétique enzymatique permet de caractériser les réactions catalysées par les enzymes à travers différents paramètres quantitatifs, tels que l'activité enzymatique (AE), la vitesse maximale de réaction (V_{max}), la fréquence de rotation catalytique (k_{cat}), la constante cinétique de la réaction (k) et la constante de Michaelis (K_m) [3]. Ces paramètres fournissent des informations essentielles sur l'efficacité catalytique de l'enzyme et sur son interaction avec le substrat.

La structure tridimensionnelle des enzymes étant indispensable à leur activité catalytique, toute modification de cette structure peut entraîner une altération, voire une perte d'activité enzymatique [3]. L'urée est un agent dénaturant couramment utilisé pour perturber les interactions non covalentes responsables du repliement des protéines, conduisant à une dénaturation partielle ou totale de l'enzyme [5].

Cet article vise à décrire la cinétique enzymatique de la β -galactosidase soumise à une dénaturation par l'urée, en analysant l'impact de cet agent dénaturant sur la structure et l'activité catalytique de l'enzyme.

II-1. Cinétique de dénaturation de la β -galactosidase par l'urée à 20°C suivie par fluorimétrie

La β -galactosidase a été incubée avec différentes concentrations d'urée afin de suivre sa dénaturation. L'évolution de la structure de l'enzyme a été

surveillée par fluorimétrie, en mesurant la fluorescence intrinsèque des résidus aromatiques ($\lambda_{exc} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 340 \text{ nm}$), reflet de l'état de repliement de la protéine. Pour chaque concentration d'urée, la dénaturation a été modélisée par une décroissance exponentielle de premier ordre :

$$[N]_t = a * e^{-kt}$$

$[N]_t$ représente l'intensité de fluorescence à l'instant t ,
 a = l'amplitude initiale et k = constante de dénaturation.

Le modèle a été ajusté aux données expérimentales à l'aide de la fonction `nls()` du logiciel R, qui réalise un ajustement non linéaire par moindres carrés pour estimer les paramètres a et k (qui ici = k_d) pour chaque condition d'urée. Les courbes ajustées ont ensuite été tracées sur les valeurs expérimentales pour visualiser la qualité de l'ajustement:

Ajustement non-linéaire de la décroissance exponentielle de premier ordre de la fluorescence de la β -galactosidase

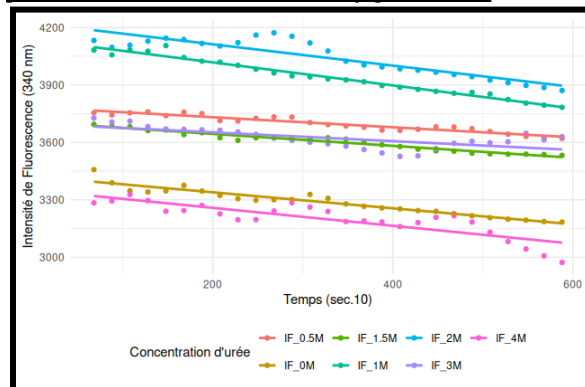


Figure 1: Ajustement non linéaire de la décroissance exponentielle de la fluorescence de la β -galactosidase. L'intensité de fluorescence a été suivie au cours du temps pour huit concentrations d'urée, codées par couleur (0M utilisée pour calibration, non représentée). Les lignes pointillées correspondent aux valeurs expérimentales, et les lignes pleines aux modèles ajustés à l'aide de la fonction `nls()`. Un graphique en taille agrandie est disponible en annexe.

Valeurs de la constante de dénaturation (k_d)

[Urée] (M)	0M	0.5M	1M	1.5M	2M	3M	4M
k_d (min^{-1})	-0.418	-0.263	-0.602	-0.313	-0.557	-0.230	-0.469

Table 1: valeurs de la constante de dénaturation (k_d) attribuées à chaque concentration d'urée, produites à partir de la fonction `nls()`

Les valeurs de la constante de vitesse de dénaturation ou d'inactivation k_d de la β -galactosidase rapportées dans la littérature se situent de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-1} min^{-1} [6]. Bien que les valeurs apparentes de k_d extraites dans notre expérience soient du même ordre

de grandeur, elles proviennent d'une approximation linéaire de la fluorescence en fonction du temps, et non d'un modèle exponentiel. Elles correspondent donc à des vitesses apparentes de diminution du signal. L'absence de tendance claire en fonction de la concentration en urée reflète probablement des erreurs de manipulation ou les limites du modèle linéaire plutôt que le comportement complexe de la dénaturation enzymatique.

II-2. Détermination de la constante cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'ONPG catalysée par la β -galactosidase en présence d'urée

L'activité enzymatique de la β -galactosidase a été étudiée par le suivi de l'hydrolyse de l'ONPG en ONP, en présence de différentes concentrations d'urée. La formation de l'ONP a été mesurée par spectrophotométrie à 420 nm. Les vitesses initiales (V_i) d'apparition du produit au cours du temps ont été déterminées sur la base du coefficient d'extinction de l'ONP ($\epsilon_{420nm} = 4500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) et de l'application de la loi de Beer-Lambert.

Comme montré par Chilaka & Nwamba [6], l'activité de la β -galactosidase diminue en présence d'urée, ce qui justifie le recours à un modèle cinétique décrivant une inactivation dépendante de la concentration.

Dans ce cadre, la dépendance de la vitesse initiale à la concentration d'urée a été décrite par une fonction exponentielle décroissante :

$$V = V_{min} + (V_{max} - V_{min}) * e^{(-k (urée - U_0))}$$

V est la vitesse initiale de la réaction, k (=k₂) = sensibilité de l'activité enzymatique à la concentration d'urée, et U₀ est un paramètre de centrage introduit pour améliorer la stabilité de l'ajustement non linéaire

Les données ont été ajustées à l'aide de la fonction nls pour estimer le paramètre k_2 , qui décrit la sensibilité de l'activité enzymatique à la concentration d'urée.

Ajustement non linéaire de la décroissance exponentielle de la vitesse initiale de la β -galactosidase en fonction de la concentration en urée

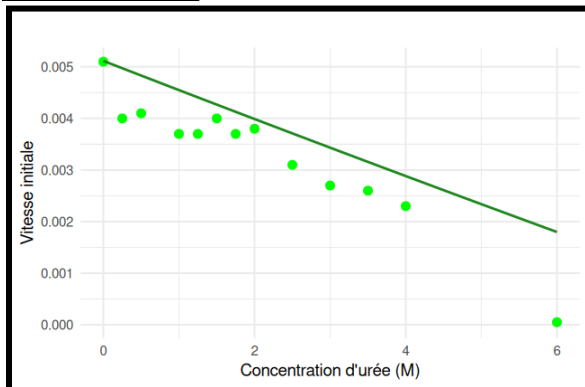


Figure 2: Ajustement non linéaire de la décroissance exponentielle de la V_i de la β -galactosidase en fonction de la concentration en

urée. Chaque point correspond à la vitesse initiale mesurée expérimentalement pour une concentration donnée d'urée, et les lignes pleines représentent le modèle exponentiel ajusté à l'aide de la fonction nls().

II-3. Analyse de la stabilité thermodynamique de la β -galactosidase

La stabilité thermodynamique de la β -galactosidase a été étudiée à l'aide d'un modèle de dénaturation chimique à deux états, dans lequel la protéine est supposée exister sous une forme native (N) ou dénaturée (D).

Dans cette hypothèse, l'énergie libre de Gibbs du dépliage dépend linéairement de la concentration d'urée selon la relation :

$$\Delta G([urée]) = \Delta G_0 - m[urée]$$

*m = paramètre de dépendance du dénaturant,
 ΔG_0 = Énergie libre de Gibbs du dépliage à 0 M d'urée*

La proportion relative des états N et D, déterminée par la valeur de ΔG est ensuite reliée à l'intensité de fluorescence mesurée, celle-ci étant modélisée comme une combinaison des contributions des états natif (S_N) et dénaturé (S_D)

$$IF([urée]) = \frac{S_N + S_D * e^{\left(\frac{m[urée] - \Delta G_0}{RT}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{m[urée] - \Delta G_0}{RT}\right)}}$$

Les données de fluorescence ont été ajustées à l'aide d'une méthode de régression non linéaire (nls).

Ajustement non linéaire d'un modèle à deux états de dénaturation du β -galactosidase en fonction de la concentration d'urée

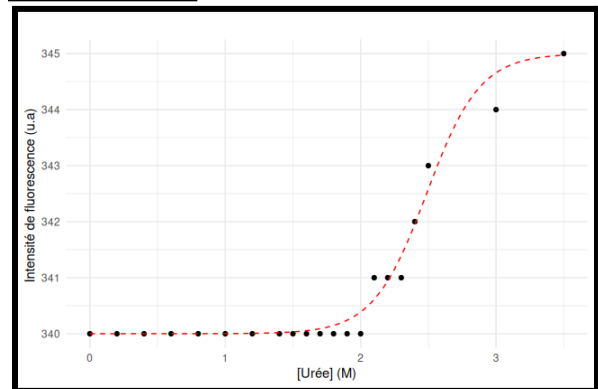


Figure 3: Ajustement non linéaire d'un modèle à deux états de dénaturation de la bêta galactosidase en fonction de la concentration d'urée. Les données expérimentales sont représentées par des points noirs (remodelées à l'aide de la fonction tablelong(), qui reproduit les valeurs pour un graphique plus lisse). Les données produites par le modèle prédictif sont représentées par une courbe sigmoïde en pointillés rouges.

Résumé du modèle non linéaire à deux états de la dénaturation du β -galactosidase en fonction de la concentration d'urée

```
Formula: IF_bgal ~ fluorescence_model(urea, m, DG0_0)

Parameters:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
m      -12605      1560   -8.082 1.44e-07 ***
DG0_0   -31352      3697   -8.479 6.99e-08 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.247 on 19 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 15
Achieved convergence tolerance: 2.44e-06
```

Figure 4 : Résultats de la fonction summary() appliquée au modèle à deux états ajusté non linéairement pour la dénaturation de la β -galactosidase. La valeur prédite de m est de $-12\,605\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ et celle de ΔG est $-31\,352\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$. Selon l'équation supposée, m devrait être positif pour que ΔG diminue lorsque la concentration d'urée augmente. Ici, m est négatif, ce qui impliquerait, de façon incohérente, une diminution de la propension à la dénaturation avec l'augmentation de l'urée. Étant donné que l'urée ne suit pas un modèle de dénaturation à deux états pour cette protéine, ces résultats incohérents soulignent l'importance du choix du modèle pour l'analyse de paramètres enzymatiques tels que ΔG et m .

Bien que la procédure d'ajustement ait convergé et produit des estimations numériques pour ΔG et m , ces paramètres ne peuvent pas être interprétés physiquement dans le cas de la β -galactosidase, car l'enzyme est une grande protéine multimérique qui se déploie à travers de multiples intermédiaires et ne présente pas un équilibre simple à deux états ou des plateaux de fluorescence bien définis [8]. Par conséquent, les hypothèses fondamentales du modèle ne sont pas respectées, ce qui empêche une analyse thermodynamique significative. Le modèle a néanmoins été appliqué à l'ensemble des données disponibles pour démontrer la méthodologie, étant donné que l'analyse prévue à l'aide de NATA n'a pas pu être réalisée.

IV Bibliographie

- [1] Husain Q. Beta galactosidases and their potential applications: a review. Crit Rev Biotechnol. 2010 Mar;30(1):41-62. doi: 10.3109/07388550903330497. PMID: 20143935.
- [2] Gray GM, Santiago NA. Intestinal beta-galactosidases. I. Separation and characterization of three enzymes in normal human intestine. J Clin Invest. 1969 Apr;48(4):716-28. doi: 10.1172/JCI106029. PMID: 5774109; PMCID: PMC322276.
- [3] Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. 2015;59:1-41. doi: 10.1042/bse0590001. Erratum in: Essays Biochem. 2015;59:75. PMID: 26504249; PMCID: PMC4692135.
- [4] Nakazawa, Y. (2025). *Structure and function of a β -1,2-galactosidase from Bacteroides xylanisolvens, an intestinal bacterium*. Communications Biology, 8, 66. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07494-1>
- [5] Bennion BJ, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 29;100(9):5142-7. doi: 10.1073/pnas.0930122100. Epub 2003 Apr 17. PMID: 12702764; PMCID: PMC154312.
- [6] Chilaka FC, Nwamba CO. Kinetic analysis of urea-inactivation of beta-galactosidase in the presence of galactose. J Enzyme Inhib Med Chem. 2008 Feb;23(1):7-15. doi: 10.1080/14756360701450244. PMID: 18341246.
- [7] Juers DH, Matthews BW, Huber RE. LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. Protein Sci. 2012 Dec;21(12):1792-807. doi: 10.1002/pro.2165. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23011886; PMCID: PMC3575911.
- [8] Kishore D, Kundu S, Kayastha AM. Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric β -galactosidase reveals multiple unfolding pathways. PLoS One. 2012;7(11):e50380. doi: 10.1371/journal.pone.0050380. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23185611; PMCID: PMC3503960.

ANNEXE

Ajustement non-linéaire de la décroissance exponentielle de premier ordre de la fluorescence de la β -galactosidase

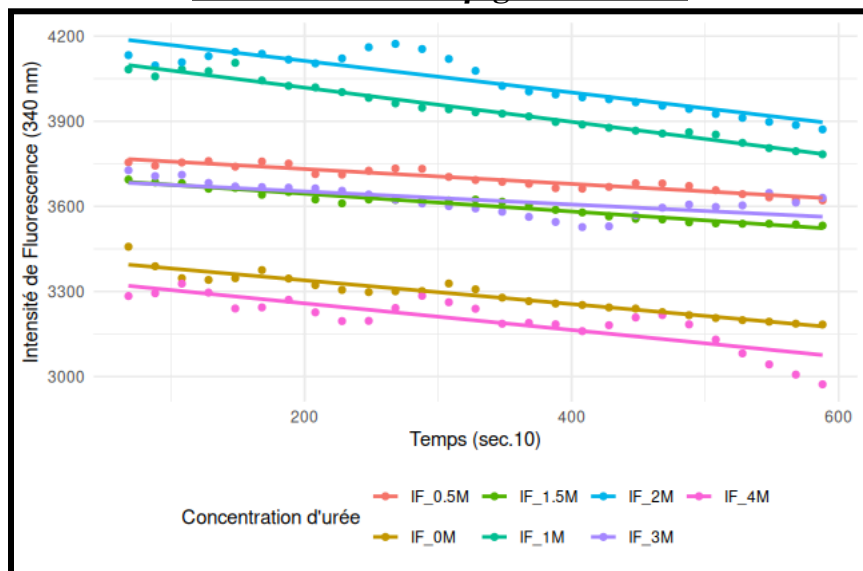


Figure 1: Ajustement non linéaire de la décroissance exponentielle de la fluorescence de la β -galactosidase. L'intensité de fluorescence a été suivie au cours du temps pour huit concentrations d'urée, codées par couleur (0 M utilisée pour calibration, non représentée). Les lignes pointillées correspondent aux valeurs expérimentales, et les lignes pleines aux modèles ajustés à l'aide de la fonction nls(). Un graphique en taille agrandie est disponible en annexe.

Ajustement non linéaire de la décroissance exponentielle de la vitesse initiale de la β -galactosidase en fonction de la concentration en urée

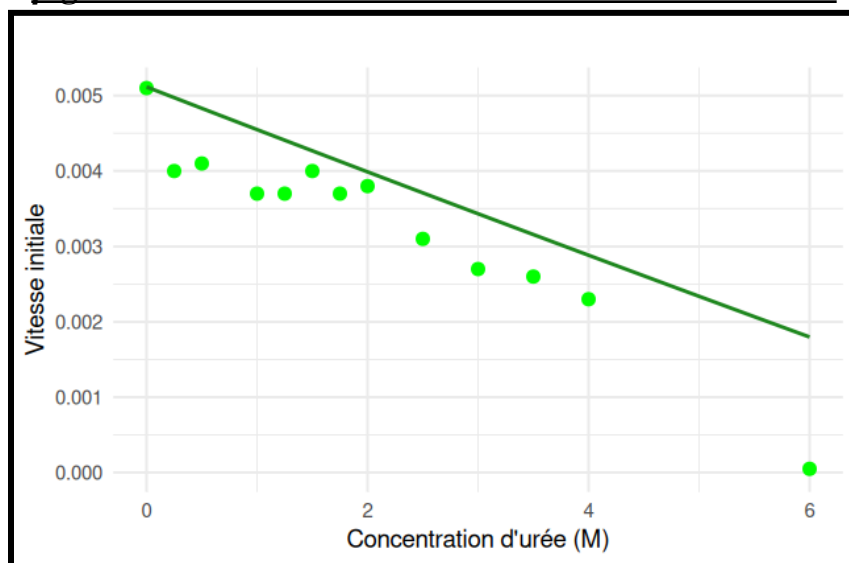


Figure 2: Ajustement non linéaire de la décroissance exponentielle de la V_i de la β -galactosidase en fonction de la concentration en urée. Chaque point correspond à la vitesse initiale mesurée expérimentalement pour une concentration donnée d'urée, et les lignes pleines représentent le modèle exponentiel ajusté à l'aide de la fonction `nls()`.

Ajustement non linéaire d'un modèle à deux états de dénaturation du β -galactosidase en fonction de la concentration d'urée

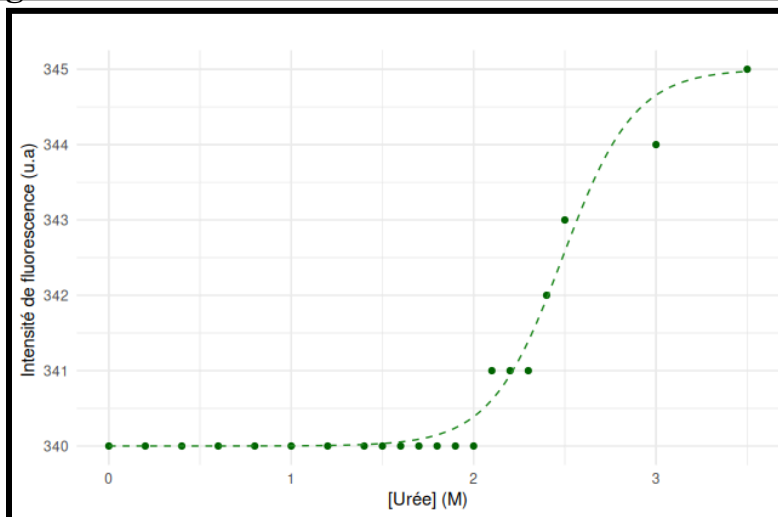


Figure 3: Ajustement non linéaire d'un modèle à deux états de dénaturation de la bêta galactosidase en fonction de la concentration d'urée. Les données expérimentales sont représentées par des points. Les données produites par le modèle prédictif sont représentées par une courbe sigmoïde en pointillés.

Résumé du modèle non linéaire à deux états de la dénaturation du β -galactosidase en fonction de la concentration d'urée

```
Formula: IF_bgal ~ fluorescence_model(urea, m, DG0_0)

Parameters:
      Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
m      -12605      1560   -8.082 1.44e-07 ***
DG0_0   -31352      3697   -8.479 6.99e-08 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 0.247 on 19 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 15
Achieved convergence tolerance: 2.44e-06
```

Figure 4 : Résultats de la fonction `summary()` appliquée au modèle à deux états ajusté non linéairement pour la dénaturation de la β -galactosidase. La valeur prédite de m est de $-12\,605\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ et celle de ΔG est $-31\,352\text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}$. Selon l'équation supposée, m devrait être positif pour que ΔG diminue lorsque la concentration d'urée augmente. Ici, m est négatif, ce qui impliquerait, de façon incohérente, une diminution de la propension à la dénaturation avec l'augmentation de l'urée. Étant donné que l'urée ne suit pas un modèle de dénaturation à deux états pour cette protéine, ces résultats incohérents soulignent l'importance du choix du modèle pour l'analyse de paramètres enzymatiques tels que ΔG et m .

