

ÉTUDE DE CAS

3

ÉTUDE DE CAS NUMÉRO 1 : QUI AURA LA
PEAU DES DÉCHETS PLASTIQUES ?

Partie 1 : Consignes à lire avant de commencer

Préparation en amont de la séance :

En amont de la séance, vous devez travailler (2h) :

- **le chapitre 4 d'enzymologie** : de la partie I à la partie III. Vous avez une version rédigée mais aussi la présentation vidéo à disposition.
- **Les exercices de préparation** très courts intercalés dans le chapitre 4
- **Les consignes du premier TD d'enzymologie** : Afin de comprendre comment traiter les documents fournis ainsi que la rédaction attendue.

Objectifs d'apprentissage :

A l'issue de cette séance, les étudiants seront capables d'analyser des résultats de cinétique enzymatique simple dans un article et de traiter des résultats de cinétique sans inhibiteur (1S, 1P)

Organisation de la séance :

Cette étude de cas est faite pour vous mettre en difficulté de prime abord. Vous allez travailler en équipe de 4 maximum afin de résoudre l'ensemble de données. Vous vous installez sur un îlot de travail. Vous avez à votre disposition des marqueurs, des feuilles véleda et de la patafix pour écrire au mur sur des « tableaux ». Vous pouvez utiliser des ordinateurs des tablettes MAIS vous ne pouvez pas utiliser l'IA. Elle ne vous permettra pas de réussir ce type de travail ni d'atteindre les objectifs d'apprentissage.

Vous **devez** échanger au sein d'une équipe mais entre membres de l'équipe pour réussir ce travail et vous équiper de :

- calculatrice
- papier millimétré, crayon gris et règle
- papier brouillon
- un support propre pour le rendu final

Accompagnement de la séance :

Au cours de la séance pour passer d'une sous partie à l'autre, vous devrez **aller voir l'enseignant pour valider votre travail**.

Vous devez également remplir un **questionnaire d'autoévaluation avant la séance (une fois que vous avez lu le cours) et après la séance** afin que je puisse adapter la séance de retour en classe entière.

A la fin de la séance, vous déposerez le fruit de votre travail en équipe en indiquant bien sur les parties individuelles qui a fait quoi dans l'espace moodle dédié. Ce document doit contenir le résultat correctement rédigé final de votre travail mais aussi vos difficultés et comment vous les avez résolues (voir la box Help).

HELP : QUE FAIRE ? _____

Vous ne pouvez pas m'interroger à chaque difficulté, vous allez suivre un parcours et remplir le document de type "Help" pour cela. Voici l'ordre du travail à réaliser quand vous ne voyez pas comment répondre à la question :

1. Reprendre la partie de cours correspondante et noter les informations
2. Aller voir dans l'énoncé de TD d'enzymologie correspondant afin de comprendre comment traiter les données et noter les informations
3. Échangez avec vos co-équipiers : notez les idées des autres
4. Échangez avec une autre équipe : notez les propositions de l'autre équipe

Vous serez autorisés à venir me demander quand vous aurez réalisé et noté toutes ces étapes.

Partie 2 : Le plastique ça se dégrade ?

Chaque année, 9 à 14 millions de tonnes de m^3 de déchets plastiques s'ajoutent au 150 millions de tonnes métriques déjà accumulées. Certains plastiques sont recyclables (polyéthylène [PE], polypropylène [PP], polyéthylène téréphtalate [PET], polychlorure de vinyle [PVC] et acide phtalique [PA]) mais la moindre contamination ou l'utilisation de composites thermosensibles empêche leur remodelage. Néanmoins, ces plastiques peuvent être une source de carbone pour les micro-organismes et des réactions de biodégradations sont observées dans différents environnements [zrimec' plastic-degrading' 2021]. Nous allons nous intéresser ici à la diversité des enzymes microbiennes capables de dégrader le plastique même à des vitesses réduites.

A. Étude de métagénomique à partir des données des campagnes Tara Oceans and global topsoil 20mn

Ces données sont basées sur un article. Certaines parties du texte sont des traductions directes de l'article afin de vous donner les informations correctes.

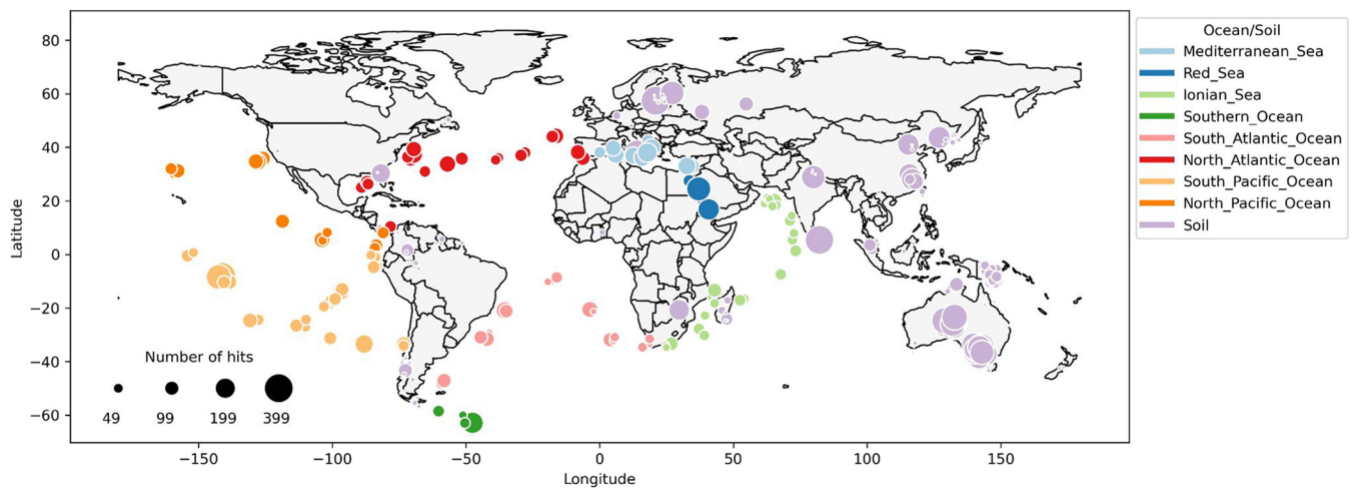
"La durée de vie estimée d'une bouteille en polyéthylène téréphtalate (PET) dans des conditions ambiantes varie de 16 à 48 ans. De plus, bien qu'une partie de la diversité microbienne reste encore inexplorée, la dégradation synergique des plastiques par les micro-organismes présente un fort potentiel pour révolutionner la gestion des déchets plastiques à l'échelle mondiale. À cette fin, les méthodes et les données sur de nouvelles enzymes dégradant les plastiques présentées ici peuvent aider les chercheurs en : (i) fournissant des informations supplémentaires sur la diversité taxonomique de ces enzymes ainsi qu'une meilleure compréhension des mécanismes et des étapes impliqués dans la dégradation biologique des plastiques, (ii) indiquant les zones où la disponibilité de nouvelles enzymes est accrue, et (iii) offrant une base pour des applications ultérieures dans la biodégradation industrielle des déchets plastiques. Il est important de noter que nos résultats apportent la preuve d'un effet mesurable de la pollution plastique sur l'écologie microbienne mondiale." [zrimec' plastic-degrading' 2021]

Question 1 Analysez les résultats de cet article en respectant la rédaction "fait, voit, interprète"

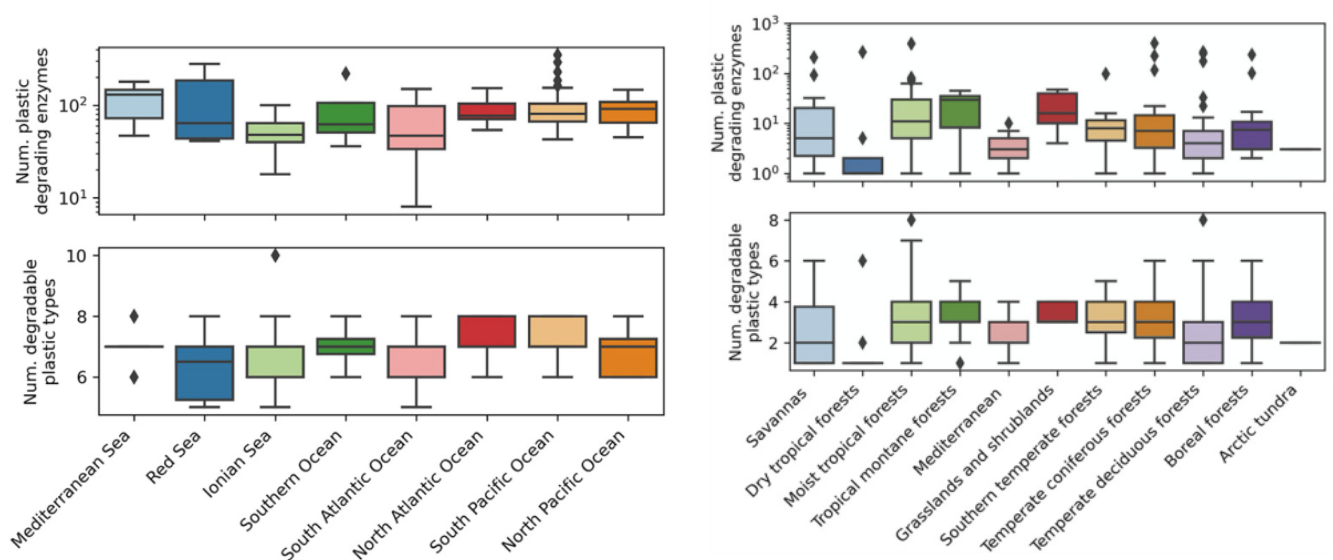
B. Réactions enzymatiques de dégradation des plastiques 20mn

De nombreuses réactions enzymatiques ont été identifiées dans la dégradation des plastiques mais souvent ces dégradations sont peu efficaces, coûteuses pour l'organisme considéré. L'ensemble des données sont disponibles dans un tableur sur moodle afin de faciliter le traitement.

Question 1 À partir des documents fournis, proposez un schéma bilan des réactions de dégradation du plastique par les micro-organismes



(a) Répartition des enzymes de dégradation du plastique identifiées à travers le monde



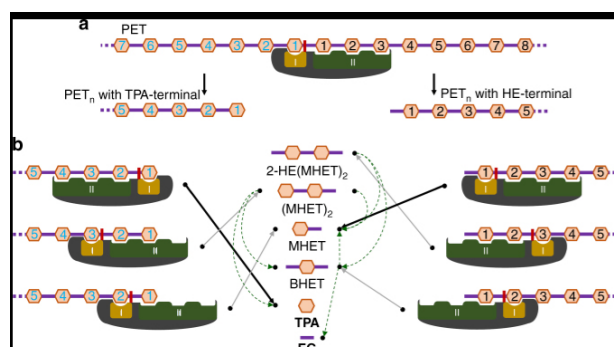
(b) Enzymes versus plastic dans les océans

(c) Enzymes versus plastic dans les sols

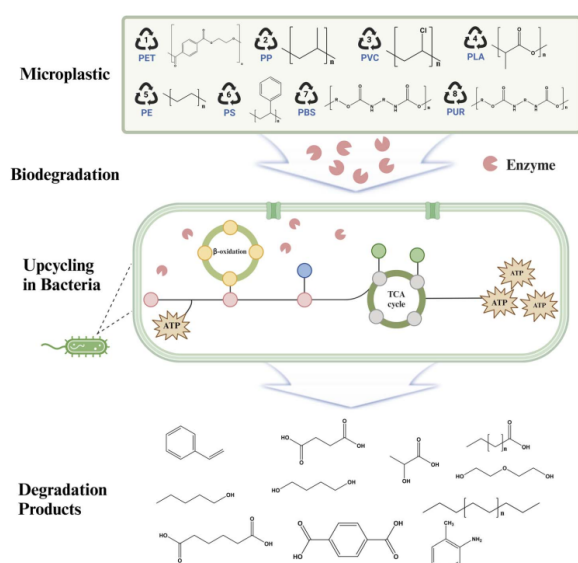
FIGURE 3.1 – Étude de métagénomique sur les enzymes de dégradation des plastics. A. Enzymes de dégradation du plastique dans le microbiome mondial. Sont représentés 11 906 occurrences d'enzymes dans les données issues des océans et 18 119 dans les données provenant des sols, obtenues en construisant des modèles HMM à partir d'enzymes connues pour dégrader le plastique, puis en les recherchant dans des ensembles de données de séquençage métagénomique. Un potentiel de dégradation allant jusqu'à 10 types de plastiques différents a été observé dans les fractions océaniques, et jusqu'à 9 types dans les fractions terrestres. B. Nombre d'enzymes de dégradation du plastique identifiées et types de plastiques dégradables trouvés dans les 8 océans. Le microbiome océanique analysé couvrirait 67 sites répartis sur 3 couches de profondeur et à travers 8 océans. C. Number of plastic-degrading enzyme hits and degradable plastic types found across 11 soil habitats. The analyzed soil microbiome spanned 169 sampling locations across 38 countries and 11 distinct environmental habitats. [zrimec`plastic-degrading`2021]

Microorganism	Enzyme	Temperature range (°C)	Biological effects (results)
Polyethylene terephthalate			
<i>Idonella sakazensis</i> 201-16	PETase	20–45	Almost completely degraded after 6 weeks
<i>Thermobifida fusca</i> DSM43793	TH	30–60	50% degraded after 3 weeks
<i>Fusarium solani</i> pisi	FsC	30–60	97% weight loss after 96 hours
<i>Thermobifida cellulolytica</i> DSM44535	Thc_Cut1	50	Increase of reactive hydroxyl or carboxyl groups
<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	Cut190 S226P/R228S	60–65	27% weight loss after 3 days
<i>Bacillus subtilis</i> 4P3-11	BsEstB	40–45	Introduction of novel carboxyl and hydroxyl groups
<i>Thermomonospora curvata</i> DSM 43183	Tcur0390	50	Stronger substrate affinity and increase of the H-S distance
Polypropylene			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WGH-6	AH alkane hydroxylase	30	17.2% weight loss after 40 days
<i>Aneurinibacillus</i> spp.	Lipase	50	44.2% weight loss after 140 days
Polyethylene			
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Lac	Room temperature	61% weight loss after 2 months
<i>Alternaria alternata</i> FB1	153 potential enzymes	30	62.79% decreased after 28 days
Polyvinyl chloride			
<i>Klebsiella</i> sp. EMBL-1	Catalase-peroxidase	30	19.57% weight loss after 3 months
Polyurethane			
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Urethane hydrolase	30	70% degradation after 10 days
Polystyrene			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071	SGT/SH	25	WCA decreased from 91.56° to 79.8° after 2 months
<i>Bacillus paralicheniformis</i> G1	Alkane monooxygenase/ cytochrome P450	30	34% weight loss after 2 months

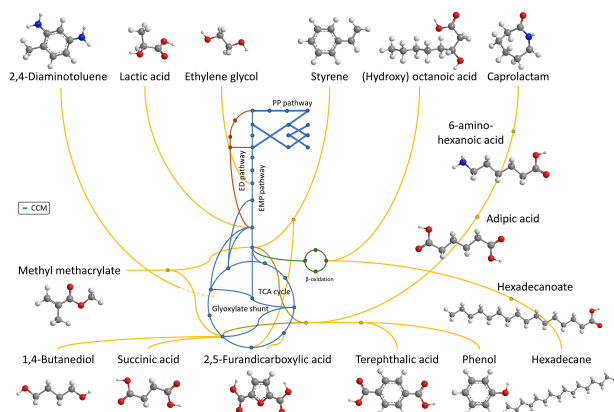
(a) réactions de dégradation



(b) Exemple de dégradation d'un polymère



(c) Vue globale du métabolisme



(d) devenir des produits de dégradation

FIGURE 3.2 – Vue de la dégradation des plastiques A. Types de plastiques dégradés par les micro-organismes et leur efficacité. Les données sont issues de l'agrégation de différentes publications par les auteurs. [choi' recent' 2024] B. Schéma du processus de dégradation du PET. a. Étape de formation des entailles ("Nick generation step"). Les unités TPA et EG du polymère PET sont représentées respectivement par des hexagones orange et des lignes violettes. L'enzyme IsPETase est illustrée en gris foncé. Les sous-sites I et II de l'IsPETase sont représentés par des schémas colorés en orange et en vert, et sont étiquetés respectivement I et II. Le résidu catalytique Ser160 est représenté par un rectangle rouge. Les polymères PET terminés par TPA ou HE sont identifiés. Les unités TPA de ces polymères PET sont numérotées de 1 à 5 à partir de chaque extrémité. b. Étape de digestion terminale ("Terminal digestion step"). Chaque réaction enzymatique de cette étape est représentée sous forme de schéma. Les produits clivés issus des réactions enzymatiques sont indiqués par des flèches noires. Les lignes pointillées vert clair indiquent les trajectoires empruntées par les produits du polymère PET vers la réaction suivante. Six composés liés au PET — 2-HE(MHET)₂, (MHET)₂, MHET, TPA, BHET et EG — qui sont des produits de clivage issus de cette étape, sont représentés. Les produits finaux de la dégradation (MHET, TPA et EG) sont indiqués en gras [joo' structural' 2018]. C. Schéma de la dégradation microbienne et enzymatique ainsi que du surcyclage des microplastiques. Les microplastiques présents dans l'environnement subissent une dégradation enzymatique par des enzymes extracellulaires, puis sont utilisés comme source de carbone par les micro-organismes, ce qui conduit finalement à leur dégradation complète. Figures générées avec BioRender [choi' recent' 2024]. D. Métabolisation des monomères issus de la dépolymérisation des plastiques. Le réseau métabolique de *Pseudomonas putida* est présenté, incluant le métabolisme central du carbone (CCM, en bleu) ainsi que certaines voies secondaires (voie d'Entner-Doudoroff – en brun, -oxydation – en vert). Les points d'entrée des voies de métabolisation des monomères plastiques dans le métabolisme central du carbone sont indiqués en jaune. Pour certains monomères, il existe des voies alternatives (voir les informations complémentaires dans le « Tableau SI » pour plus de détails), mais elles ne sont pas représentées ici afin de préserver la clarté du schéma [tiso' metabolic' 2022]

Partie 3 : Ingénierie enzymatique pour le recyclage du plastique

”Le plastique polyester est l’un des types de plastiques les plus largement utilisés dans la vie quotidienne. Rien qu’en 2013, environ $5,610^7$ tonnes de plastique polyester ont été produites, tandis que moins de 30 % de cette quantité totale a été recyclée . Les principales méthodes de recyclage du plastique incluent des méthodes chimiques et biologiques.

Cependant, la dégradation chimique du plastique nécessite des conditions de haute température et de haute pression , tout en consommant une grande quantité d’énergie. De plus, cette approche génère de nombreuses substances toxiques et nocives pour l’environnement, et présente un risque de pollution secondaire .

En revanche, la méthode de biodégradation semble plus douce et plus respectueuse de l’environnement, offrant ainsi une nouvelle approche pour la valorisation des produits plastiques [7,14]. Les recherches antérieures ont principalement utilisé des cutinases dérivées de *Thermobifida fusca* (T. fusca) , *Fusarium solani pisi* , et *T. cellulosilytica* [17]; ces enzymes étaient capables de dégrader le PET dans une certaine mesure à 50 °C, mais se montraient inefficaces à température ambiante.

Jusqu’à présent, le potentiel prometteur de l’enzyme PETase n’a pas encore été exploité dans des applications concrètes. Afin d’améliorer l’activité de dégradation du plastique polyester par la PETase, une modification de la protéine par conception rationnelle a été réalisée — une approche qui s’est déjà révélée efficace pour renforcer l’activité des cutinases utilisées précédemment [ma`enhanced`2018].”

Nous allons étudier dans cette partie l’efficacité des mutations enzymatiques réalisée sur la PETase sur le site actif de l’enzyme.

A. Analyse de l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique sur le PET 30mn

Matériel et Méthode

Avant l'hydrolyse du PET, tous les films ont été lavés en trois étapes consécutives, chacune durant 30 minutes : d'abord dans une solution à 1 % de SDS, ensuite avec de l'éthanol, et enfin avec de l'eau déionisée. Un film de PET (1,5 cm × 1,0 cm) a été placé dans une solution réactionnelle contenant 5 µg de PETase et 1,5 mL de bicine-NaOH à 50 mmol L⁻¹ (pH 8,5), et la réaction a été menée pendant 48 heures à 30 °C. La réaction a été arrêtée par dilution de la solution aqueuse avec du NaOH à 1,0 mol L⁻¹, suivie d'un traitement thermique (50 °C pendant 10 minutes). Les films de PET préalablement lavés ont ensuite été lavés de nouveau, séchés, puis soumis à une détermination gravimétrique de la perte de masse. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat, et des contrôles ont été effectués en utilisant 1,5 mL de bicine-NaOH (pH 8,5) sans enzyme [ma'enhanced'2018].

Résultats

TABLE 3.1 – Mesure de la dégradation du PET par les enzymes mutées [ma'enhanced'2018]

Mutant	Vitesse de dégradation du plastique en mg par umol/L/jour				
	Non mutée	I179F	L88F	R61A	rien
exp1	9	12	18	21	0.5
exp2	7	14	18.5	20	0.25
exp3	10	10	17.5	22	0.75

Question 1 Valeurs mesurées

Les données sont exprimées en mg par umol/L/jour. Pouvez associer cette valeur à une grandeur explicitée dans le cours d'enzymologie.

Question 2 Traitez et analyser les résultats

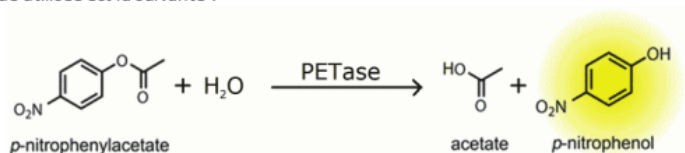
Vous devez utiliser les fonctions statistiques vues en L1 pour traiter les données et vous devez choisir une représentation graphique cohérente. L'analyse de ces données traitées doit suivre le plan "fait/voit/interprete".

B. Obtention des constantes cinétiques sur un substrat synthétique 1h30

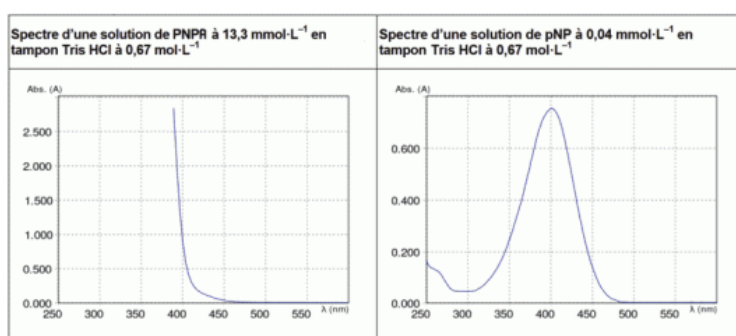
Matériel et Méthode

”Les mesures d’activité ont été effectuées en utilisant l’acétate de para-nitrophényle (PNPA) comme substrat afin d’analyser les paramètres cinétiques de Michaelis, comme décrit précédemment [29, 33, 34]. Les paramètres cinétiques ont été déterminés à 30 °C et à un pH de 7,0, avec des concentrations de substrat allant de 0,5 à 8,0 mmol·L⁻¹. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat. [ma`enhanced`2018]”

La réaction enzymatique utilisée est la suivante :



Spectre d’absorption du PNPA et du PNPP



Résultats

TABLE 3.2 – Mesures de cinétiques enzymatique des formes sauvages et mutées des PETases en présence du substrat PNPA. Les enzymes sont utilisées à une concentration fixe de 1mmol/L.

Vitesse de réaction en mmol/L/s (PNPA en mmol/L)												
So	PETase			I179F			L88F			R61A		
	exp1	exp2	exp3	exp1	exp2	exp3	exp1	exp2	exp3	exp1	exp2	exp3
0.5	2.65	2.45	2.9	31.68	31.48	31.93	5.21	5.01	5.46	4.19	3.99	4.44
1	4.82	4.62	5.07	48.95	48.75	49.2	9.33	9.13	9.58	7.62	7.42	7.87
2	8.18	7.98	8.43	67.31	67.11	67.56	15.45	15.25	15.7	12.89	12.69	13.14
3	10.66	10.46	10.91	76.93	76.73	77.18	19.76	19.56	20.01	16.76	16.56	17.01
4	12.56	12.36	12.81	82.85	82.65	83.1	22.97	22.77	23.22	19.72	19.52	19.97
5	14.06	13.86	14.31	86.85	86.65	87.1	25.45	25.25	25.7	22.05	21.85	22.3
6	15.28	15.08	15.53	89.75	89.55	90	27.43	27.23	27.68	23.94	23.74	24.19
7	16.29	16.09	16.54	91.94	91.74	92.19	29.04	28.84	29.29	25.5	25.3	25.75
8	17.14	16.94	17.39	93.65	93.45	93.9	30.37	30.17	30.62	26.82	26.62	27.07

Question 1 Justifier l’utilisation du para-nitrophénylacétate (PNPA) comme substrat dans le cadre de la mesure d’activité des différentes PETases

Question 2 **Traitement des données cinétiques**

Chaque étudiant de l'équipe prend en charge une enzyme. Vous devez d'abord utiliser les fonctions statistiques moyenne et écart-type pour chaque enzyme (vitesse moyenne de réaction pour chaque concentration en substrat). Ensuite, vous devez utiliser la méthode décrite dans l'énoncé du premier TD d'enzymologie afin d'obtenir le mécanisme et les constantes cinétiques de chaque enzyme. Les courbes sont à réaliser sur papier millimétré et sur un tableur.

Question 3 **Comparaison des enzymes**

L'analyse de ces données traitées doit suivre le plan "fait/voit/interprete". Les données doivent être comparées en utilisant k_{cat}/K_m et l'efficacité catalytique.

C. Bonus : Analyse structurale des mutants 20mn

La structure de la PETase est disponible dans <https://www.rcsb.org/>. Vous pouvez télécharger le fichier pdb codant la structure avec le code 5XG0. C'est la PETase sauvage de *Ideonella sakaiensis* en complexe avec des analogues. Vous pouvez aussi regarder la structure directement sur la protéine data bank.

Pour visualiser, manipuler la structure de la PETase sur votre ordinateur vous pouvez télécharger pymol ici.

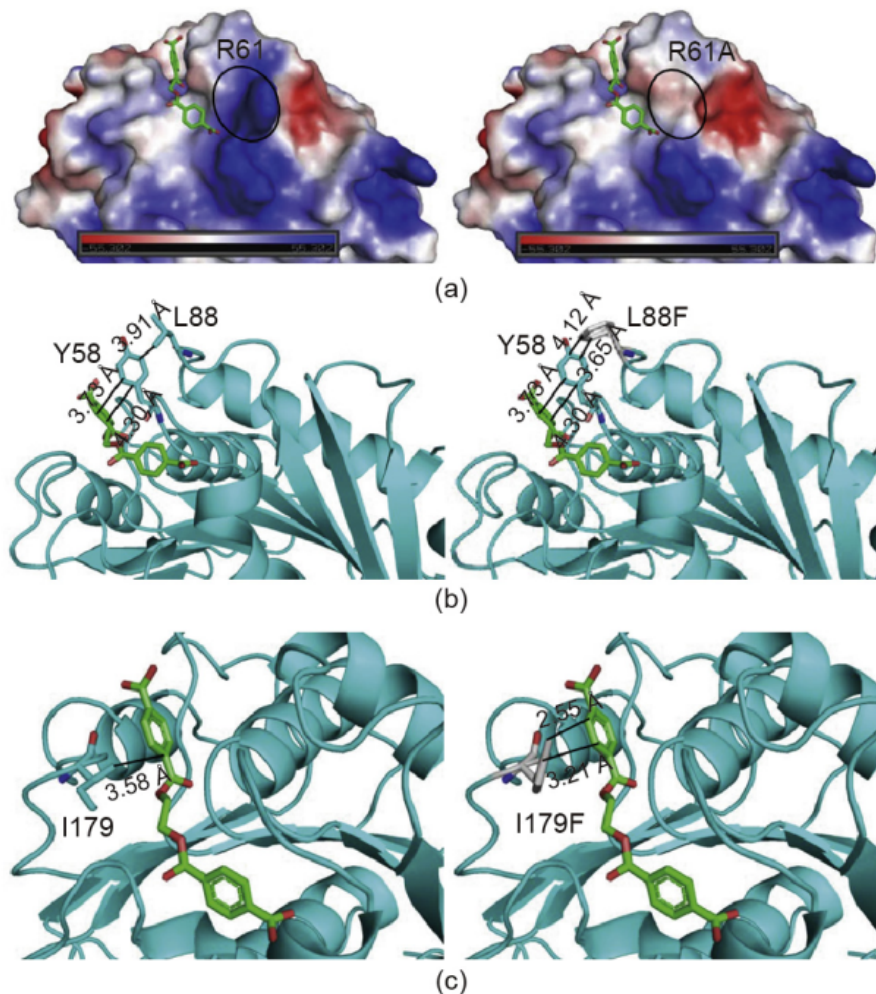


FIGURE 3.3 – Comparaison et analyse de différentes PETases mutantes. (a) Analyse du potentiel de surface électrostatique de la souche sauvage R61 et de la mutante R61A (le rouge, le bleu et le blanc représentent respectivement les valeurs négatives, positives et neutres) ; (b) structure de la souche sauvage L88 et de la mutante L88F en complexe avec le 2PET ancré dans le site de liaison ; (c) structure de la souche sauvage I179 et de la mutante I179F en complexe avec le 2PET ancré dans le site de liaison. (Le 2PET est représenté sous forme de bâtonnets rouges et verts.)

Question 1 proposez des explications aux observations réalisées précédemment sur la cinétique des différents mutants.

Temporary page!

$\LaTeX$ was unable to guess the total number of pages correctly. As there was some unprocessed data that should have been added to the final page this extra page has been added to receive it.

If you rerun the document (without altering it) this surplus page will go away, because $\LaTeX$ now knows how many pages to expect for this document.