

COMPOSITION DE BIOLOGIE

Durée: 3 heures

L'usage d'une calculatrice est interdit pour cette épreuve.

L'ensemble des expériences décrites ci-dessous doit vous amener à proposer un modèle de régulation du cycle de Benson-Calvin. Vous ne vous intéresserez qu'à une seule des enzymes présentes dans ce cycle, la phosphoribulokinase (PRK). La première partie du travail consistera à replacer la PRK dans le cycle de Calvin et à comprendre son mode d'action. La seconde partie portera sur sa régulation en fonction des conditions physiologiques.

1. La PRK et le cycle de Benson-Calvin

1.1 Rappeler brièvement le rôle du cycle de Benson-Calvin, sa localisation dans la cellule et ses étapes clés. Il sera important de le corrélér à la phase primaire de la photosynthèse.

La PRK est une enzyme de type Michaelis-Menten à deux substrats. Elle existe sous deux états d'oxydo-réduction qui ont des propriétés cinétiques différentes. Elle catalyse la phosphorylation du ribulose 5-phosphate (Ru5P) par l'ATP en ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) en présence de magnésium : $Ru5P + ATP \longrightarrow RuBP + ADP$.

Dans les tableaux ci-dessous est rapportée l'activité de la PRK, réduite ou oxydée, en fonction de différentes concentrations de Ru5P ou d'ATP. Afin de se ramener au cas d'une enzyme à un substrat, la concentration de l'un est maintenue en excès tandis que celle de l'autre varie.

Activité de la PRK réduite en fonction de la concentration d'ATP ($[Ru5P] = 1 \text{ mM}$)

[ATP] μM	0	5	10	15	20	30	40	50	75	100	150	200	400	500	1000
V s ⁻¹	0	4,3	7,6	11,5	16	19,4	20,7	24	29,6	34,2	38,5	42,4	46	50	50

Activité de la PRK réduite en fonction de la concentration de Ru5P ($[ATP] = 1 \text{ mM}$)

[Ru5P] μM	0	5	10	15	20	30	40	50	75	100	150	200	400	500	1000
V s ⁻¹	0	4,4	7,4	10	12,5	19,2	23,2	24,4	31,2	34,5	40	41,7	47,6	50	50

Activité de la PRK oxydée en fonction de la concentration d'ATP ($[Ru5P] = 1 \text{ mM}$)

[ATP] μM	0	10	25	40	50	70	80	100	200	300	500	1000	1500
V s ⁻¹	0	0,01	0,025	0,035	0,037	0,05	0,055	0,07	0,076	0,085	0,097	0,107	0,11

Activité de la PRK oxydée en fonction de la concentration de Ru5P ($[ATP] = 1 \text{ mM}$)

[Ru5P] μM	0	10	25	40	50	70	80	100	200	300	500	1000	1500
V s ⁻¹	0	0,01	0,02	0,028	0,033	0,045	0,05	0,058	0,071	0,085	0,092	0,11	0,11

1.2. Rappeler le principe de la cinétique michaélienne pour une enzyme à un substrat. Déterminer, à l'aide de la représentation de Lineweaver-Burk, les paramètres cinétiques de la PRK oxydée et de la PRK réduite et commenter les résultats obtenus. Que vous suggèrent les paramètres de la forme oxydée ?

2. La régulation de la PRK au sein du cycle de Benson-Calvin

Différents métabolites présents dans le chloroplaste peuvent contrôler le flux du cycle de Benson-Calvin en agissant sur les enzymes qui le constituent. Les effets susceptibles d'être engendrés

seront étudiés sur la PRK.

Les premières indications apportées ci-dessous illustrent la variation des teneurs en différents métabolites dans le chloroplaste en fonction des conditions d'obscurité-lumière (Figures 1 et 2) ainsi que l'état d'oxydo-réduction de facteurs protéiques appelés les thiorédoxines (schéma 1).

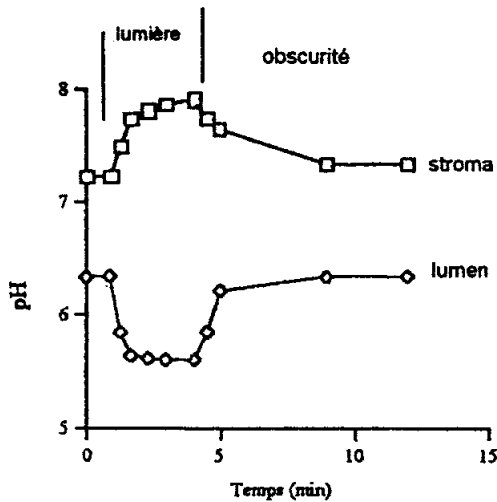


Fig 1 : Variation du pH

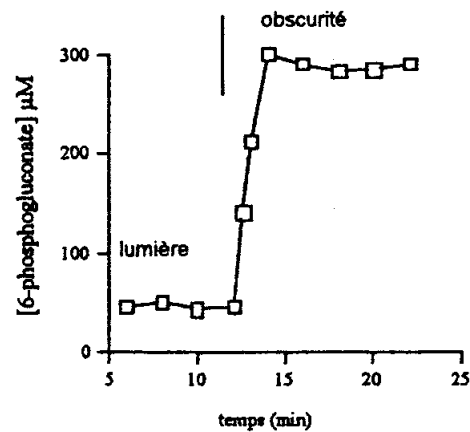


Fig 2 : Variation du 6-Phosphogluconate

Les thiorédoxines (Td) chloroplastiques sont des protéines qui existent, soit sous forme réduite à la lumière, soit sous forme oxydée à l'obscurité. Elles présentent une séquence consensus au site actif Cys-Gly-Pro-Cys. A l'état oxydé, un pont disulfure est formé entre les deux résidus cystéine. A la lumière, le pont disulfure est réduit grâce à l'action d'une enzyme, la ferrédoxine thiorédoxine reductase (FTR), elle-même réduite par la ferrédoxine (Fed).

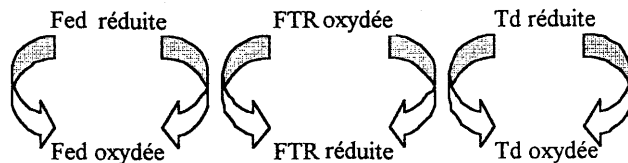


Schéma 1 : Réduction des thiorédoxines

2.1. Une fois réduites, les thiorédoxines peuvent alors réduire des enzymes cibles du cycle de Calvin. D'où vient le pouvoir réducteur ?

L'activité de la PRK réduite d'épinard est mesurée en fonction du pH. (Figure 3)

De même, l'activité de la PRK réduite est mesurée en fonction de la concentration de 6-phosphogluconate (Figure 4). Des études sur la nature de l'inhibition ont été réalisées (Figure 5). Elle est de type non compétitive par rapport à l'ATP.

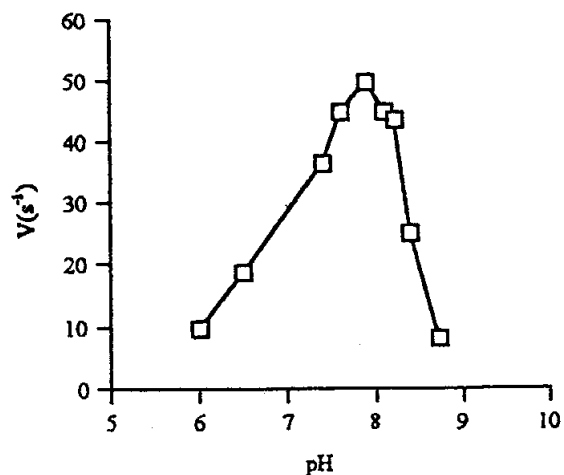


Fig 3 : Activité de la PRK en fonction du pH

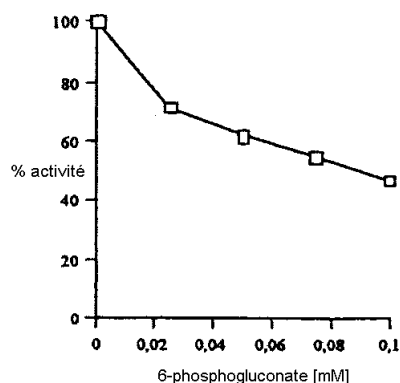


Fig 4 : Inhibition de la PRK par le phosphogluconate

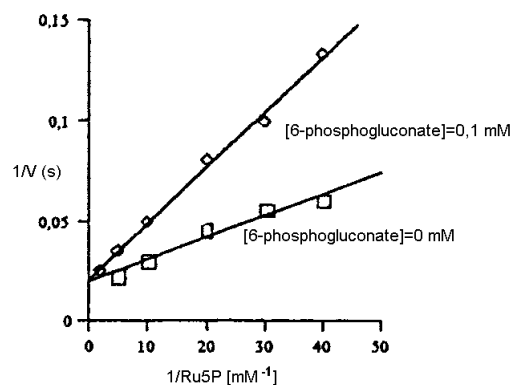


Fig 5 : Représentation de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PRK par le phosphogluconate

On a déterminé les séquences en acides aminés de différentes PRK :

- Quatre résidus cystéine ont été mis en évidence. Chez l'épinard, ils se trouvent aux positions 16, 55, 244 et 250. Deux ponts disulfure peuvent se former entre les résidus cystéine 16 et 55 d'une part, et les résidus cystéine 244 et 250 d'autre part.
- Le domaine de fixation de l'ATP regroupe les acides aminés 11 à 23.
- Par mutagenèse dirigée, les résidus cystéine ont été transformés en résidu sérine. L'activité enzymatique des quatre mutants à l'état réduit est mesurée et notée ci-dessous.

PRK obtenue par mutation	(Activité PRK mutée / Activité PRK sauvage) X 100
C16S	90±20
C55S	9±2
C244S	80±18
C250S	90±10

2.2. A l'aide de ces données et des résultats obtenus dans la première partie, commenter les figures et tableaux ci-dessus.

2.3. Déterminer la nature de l'inhibition par rapport au Ru5P et le paramètre K_i qui y est associé.

2.4. Comment pouvez-vous corréliser l'état d'oxydo-réduction de la PRK à son activité ?

3. Conclusion

A l'aide de l'ensemble de ces résultats et des indications données dans le texte, résumer, sous forme d'un schéma, les différents mécanismes mis en jeu pour réguler la PRK au sein du cycle de Benson-Calvin dans le chloroplaste en fonction des conditions d'obscurité-lumière.