

Devoir à la maison

Mai 2026

Épreuve d'analyse de documents de biologie

durée : environ 1h15

La synthèse de la RubisCO

D'après ENS 1997

La RubisCO (= Ribulose 1-5 biphosphate Carboxylase Oxygénase) est une enzyme fondamentale impliquée dans la photosynthèse des cellules eucaryotes végétales. Elle se trouve dans le stroma des chloroplastes et permet de fixer le CO₂ atmosphérique.

1) Nombre de sous-unités de la RubisCO

La RubisCO est formée par l'association de sous-unités S et L en dimères. Chaque dimère est constitué d'une chaîne légère S (pour «small») et lourde L (pour «Large»). Le tableau I ci-dessous résume les principales caractéristiques des deux chaînes de la RubisCO du Pois (*Pisum sativum*), modèle choisi pour cette étude.

Sous-unité	Nombre d'acides aminés	Nombre d'acides aminés
	Pro-chaînes	Formes matures
S	180	123
L	475	475

Tableau I

Afin de connaître le nombre de dimères formant la RubisCO active, l'enzyme native, purifiée à partir des chloroplastes est chromatographiée sur une colonne de gel-filtration, préalablement calibrée avec des protéines de masse connue. Le tableau II regroupe les temps de rétention observés pour les protéines témoins et pour la RubisCO. On rappelle que la masse moléculaire d'un acide aminé est de l'ordre de 100 Da.

Masse (kDa)	669	440	150	81	43	17	RubisCO
Rétention (min)	10,2	11	13	14,1	15,5	17	10,8

Tableau II

Question 1 – Déterminer, en précisant le raisonnement, la structure de la RubisCO.

2) Localisation des gènes codant pour les sous-unités S et L

On connaît des molécules antibiotiques qui bloquent la synthèse protéique à l'étape de la traduction. Certains d'entre eux comme le chloramphénicol sont spécifiques des Procaryotes, chloroplastes et mitochondries, d'autres comme la cycloheximide sont spécifiques des Eucaryotes.

On a remarqué que la présence d'antibiotiques dans les milieux de culture de cellules chlorophylliennes isolées modifie l'incorporation de méthionine marquée au ³⁵S dans les chaînes de la Rubisco.

Dans cette première expérience, les cellules de parenchyme de feuilles de *Pisum sativum* sont mises en culture en présence de l'un ou l'autre des antibiotiques, ajouté 30 minutes après la méthionine ³⁵S.

Un témoin sans antibiotique a également été réalisé. La quantité de radioactivité incorporée dans les différentes chaînes de la Rubisco est ensuite mesurée. (Figure 1).

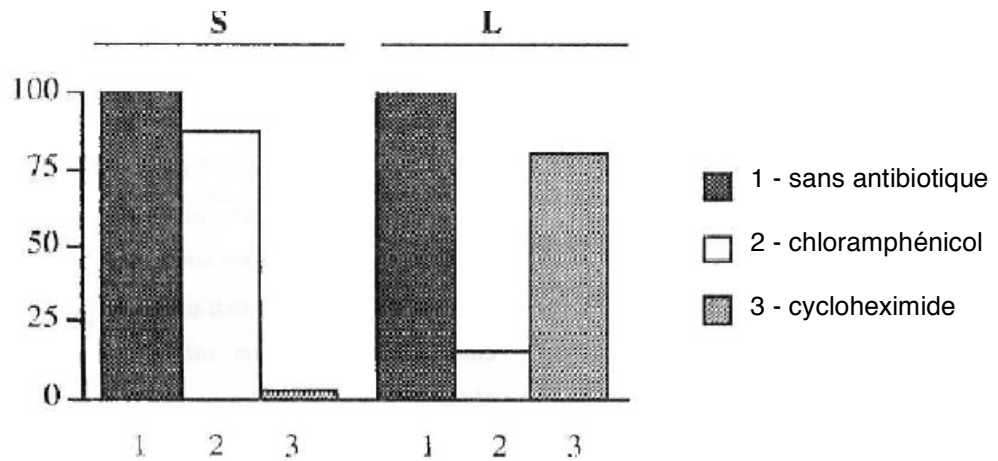


Figure 1 : quantification de la radioactivité incorporée dans les chaînes lourdes (L) et légères (S) de la RubisCO. L'expérience est réalisée en présence ou en absence des antibiotiques mentionnés dans la légende. Les résultats ont été normalisés sur la valeur obtenue pour le témoin sans antibiotique pour chacune des deux chaînes (ramenée à 100%).

Question 2 – Analyser le document afin de déduire la localisation des gènes des sous-unités S et L de la RubisCO. Proposer deux hypothèses du déroulement de la synthèse des deux sous-unités.

3) Voies de biosynthèse des chaînes S et L

Afin de préciser les localisations des voies de biosynthèse des chaînes S et L de la RubisCO, les ARNm sont extraits du cytosol et traduits *in vitro* en présence de méthionine ^{35}S . La figure 2 présente la migration sur gel d'électrophorèse des produits de la traduction *in vitro* en conditions dénaturantes. On a déposé soit l'ensemble des produits de traduction (puits 1), soit les protéines précipitées grâce à un anticorps anti-S (puits 2), soit les protéines précipitées grâce à un anticorps anti-L (puits 3), soit la RubisCO radiomarquée extraite et purifiée à partir de chloroplastes (puits 4).

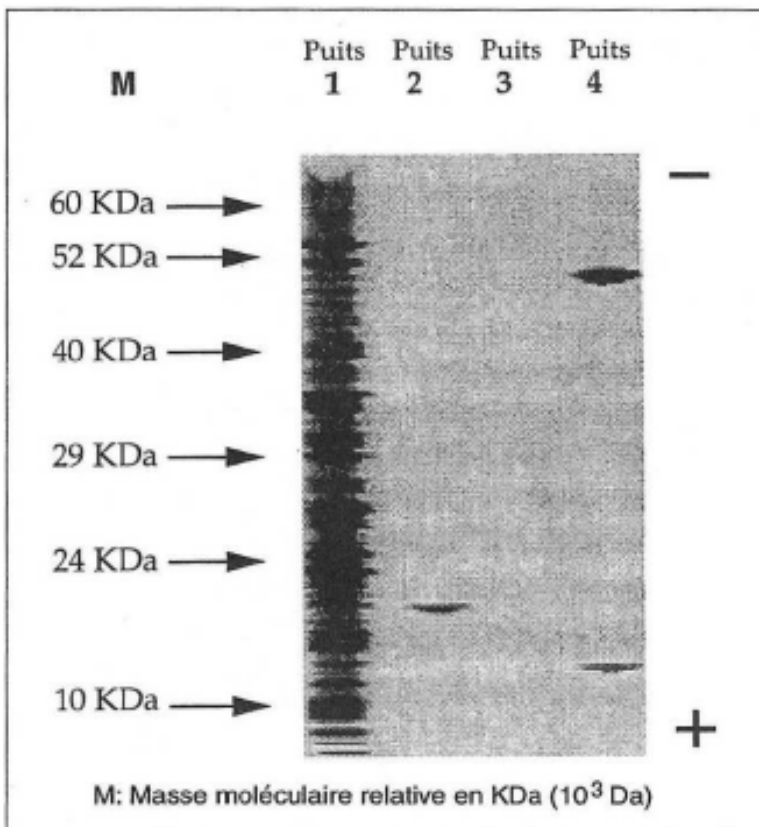


Figure 2 : autoradiographie après électrophorèse de protéines en conditions dénaturantes (SDS)

Puits 1 : produits de la traduction *in vitro* des ARNm extraits

Puits 2 : immunoprécipitation des protéines obtenues dans le puits 1, avec des anticorps anti-S

Puits 3 : immunoprécipitation des protéines obtenues dans le puits 1, avec des anticorps anti-L

Puits 4 : RubisCO radiomarquée extraite et purifiée à partir de chloroplastes de *Pisum sativum*

Question 3 - Analyser et interpréter le gel obtenu.

4) Contrôle de la transcription du gène de la sous-unité S

a) Influence de la lumière

On place des cotylédons de tomate (partie de la graine) dans différentes conditions d'exposition à la lumière durant la germination. Puis on réalise une mesure de la quantité d'ARNm de gène *rbcS* de la petite sous-unité de la RubisCO selon le protocole suivant :

- extraction des ARNm de cellules de cotylédons ;
- électrophorèse des ARNm puis transfert sur filtre de nitrocellulose. La révélation est réalisée avec une sonde ADN marquée radioactivement, complémentaire de la région 3' de l'ARNm. La sonde a été obtenue par PCR.

Question 4 - Nommer la technique employée (électrophorèse - transfert puis marquage).

Question 5 - Expliquer en quoi consiste une PCR et à quoi sert ici l'emploi de la sonde.

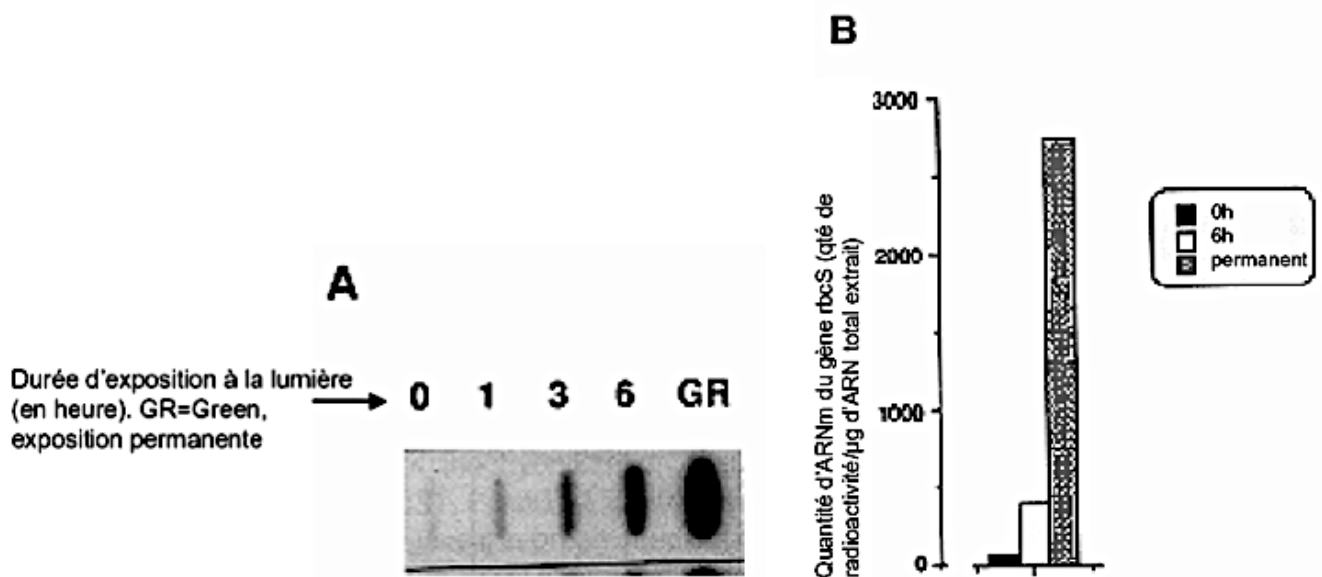


Figure 3 : résultats des dosages d'ARNm du gène *rbcS* dans différentes conditions de lumière. A - montage des gels d'électrophorèse obtenu avec des durées d'éclairement variables. B - Quantité d'ARNm du gène *rbcS* par rapport à la quantité totale d'ARN extraits.

Question 6 – Indiquer l'effet de la lumière sur la synthèse de la sous-unité S en précisant l'étape sous contrôle de la lumière. Aucune justification n'est demandée.

b) Facteurs moléculaires impliqués

On cherche à identifier les facteurs impliqués dans la régulation par la lumière.

On réalise alors une expérience dite de retard de gel dont le protocole est le suivant :

- on obtient un fragment d'ADN de la région -220 à -40 en amont du gène *rbcS* ;
- on incube ces fragments avec des extraits de protéines nucléaires de cellules de cotylédons exposées ou non à la lumière.
- les produits de l'incubation sont ensuite mis à migrer sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes.
- puis on réalise un transfert sur nitrocellulose (Southern blot). La présence d'ADN est révélée.

Remarque : la boîte TATA est en position -10. Il existe une séquence distincte de la boîte TATA dans la zone -40, appelée LRP.

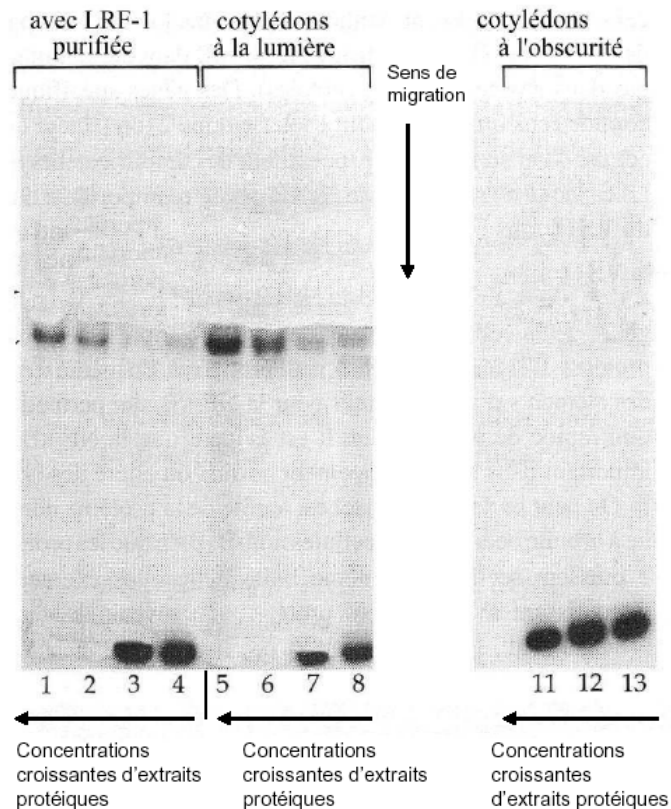


Figure 4 : Résultats de l'électrophorèse selon la méthode de retard sur gel.

Puits 11 à 13 : les fragments d'ADN sont incubés avec des protéines nucléaires extraites de cotylédons laissés à l'obscurité.

Puits 5 à 8 : les fragments d'ADN sont incubés avec des protéines nucléaires extraites de cotylédons exposés en permanence à la lumière.

Puits 1 à 4 : une protéine nucléaire particulière a été purifiée, appelée LRF-1, à partir de cotylédons exposés à la lumière. Elle est soupçonnée d'agir dans la voie de réponse à la lumière.

Question 7 – Analyser les pistes 11 à 13.

Question 8 – Que montrent les pistes 5 à 8 sur l'effet de la lumière ?

Question 9 – Dédurre des pistes 1 à 4 le rôle présumé de LRF-1 sur le gène rbc-S.

Question 10 – Proposer une expérience pour vérifier que LRF-1 se fixe bien sur la zone étudiée.

Question 11 – Réaliser un schéma bilan de la synthèse de la RubisCO.