
ÉPREUVE ÉCRITE DE BIOLOGIE

ENS : PARIS LYON CACHAN

Coefficients : PARIS : Option Biologie : 7 / Option Géologie : 4

LYON : Option Biologie : 8 / Option Sciences de la terre : 4

CACHAN : 8

MEMBRES DU JURY : D. BUSTI, N. CAUDRON, A. CORBIN, C. DUBACQ, M.-H. KRYSZKE, G. PEYROCHE, B. SCHNEIDER

L'épreuve de biologie, d'une durée de 6 heures, comportait un sujet de synthèse (durée conseillée 1 h 30) et trois sujets avec documents (durée conseillée 4 h 30) reliés par un thème commun : métabolisme de l'ADN et cycle cellulaire. Une des principales difficultés de l'épreuve était pour les candidats de parvenir à bien gérer leur temps de composition ; seule une petite partie d'entre eux ont traité de manière approfondie la totalité des sujets.

Il était indispensable de bien comprendre et délimiter le sujet de synthèse, puis de mobiliser rapidement les connaissances requises, afin de garder suffisamment de temps pour les trois autres sujets. Dans les sujets avec documents, il était important de consacrer du temps à la réflexion et il ne fallait pas omettre, après avoir analysé les différentes étapes d'une expérience, d'en donner la conclusion générale. Rappelons que les réponses doivent être rédigées pour être pleinement prises en compte. Elles doivent cependant rester concises : il est inutile de paraphraser l'énoncé ; il faut éviter les redites, décrire les résultats en allant droit à l'essentiel et les interpréter sans extrapoler. Ainsi, il apparaît tout à fait déraisonnable de consacrer jusqu'à une page et demie pour analyser une figure et il faut faire attention à ne pas aller au-delà de ce que montrent effectivement les résultats d'une expérience lors de l'interprétation, de façon à ne pas tirer des conclusions injustifiées comme l'ont fait certains candidats imprudents. Étaient récompensées, à travers ces trois sujets, la clarté de l'analyse et la logique du raisonnement.

Comme à l'accoutumée, il convenait également d'accorder la plus grande attention à la rigueur de rédaction. Le vocabulaire doit toujours être employé avec discernement : les « protéines totales » ne sont pas les « protéines cytoplasmiques », « phosphorylation » n'est pas synonyme d'« activation », ni « permettre » de « provoquer ». Pour citer quelques confusions parmi les plus sérieuses rencontrées dans les devoirs, certains candidats évoquent la séquence nucléotidique d'une protéine qui se lie à l'ADN par appariement de bases ; à l'inverse, d'autres décrivent l'ADN comme un polymère d'acides aminés, ou encore présentent la réaction de phosphorylation comme un transfert d'ADP. Lors du commentaire d'une électrophorèse, le terme de « bande » est préféré au terme de « tache ». Enfin, certains lapsus sont particulièrement malvenus dans les conclusions tirées de certaines expériences (par exemple, entre « sauvage » et « mutant »).

Le jury n'attendait pas qu'une introduction et une conclusion soient rédigées pour l'ensemble de l'épreuve.

SUJET DE SYNTHESE

La question de synthèse devait être traitée sous la forme d'un devoir rédigé, illustré et organisé. Elle impliquait de définir la notion de cycle cellulaire, en ne la limitant pas à l'étape de division cellulaire, et en incluant une description précise de l'interphase. Une présentation illustrée de la mitose et de la méiose était attendue ; elle devait faire clairement ressortir les principales différences entre ces deux processus, en indiquant notamment que la méiose correspond à deux divisions cellulaires successives sans réplication intermédiaire de l'ADN. Il était alors possible de souligner l'importance biologique de la mitose (multiplication végétative, élaboration des organismes pluricellulaires, croissance et régénération de l'organisme animal ou végétal...) et de la méiose (brassages interchromosomique et intrachromosomique), en rappelant que la production de nouvelles cellules ne peut se faire que par division de cellules préexistantes.

Sans que cela nuise à la clarté et à la précision du contenu, il était judicieux d'avoir recours le plus souvent possible à des schémas (par exemple pour la description des étapes du cycle, de la mitose et de la méiose) ou à des diagrammes (présentant par exemple l'évolution de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire). Le sujet permettait de vérifier l'assimilation de ces concepts qui sont au cœur de la biologie contemporaine, en faisant appel à des connaissances de biologie animale et de biologie végétale, et en associant des aspects de biologie des organismes, de biologie cellulaire et de biochimie.

Très souvent, les phénomènes biochimiques se déroulant en interphase étaient à peine évoqués ; on attendait pourtant une description, même succincte, des processus de réplication et de ségrégation de l'ADN, de croissance cellulaire, de duplication du centrosome et des organites cellulaires. Le caractère semi-conservatif de la réplication de l'ADN était souvent omis ou non compris ; la nécessité d'amorcer la synthèse d'ADN par la polymérisation de ribonucléotides devait être expliquée. L'étape de cytokinèse était souvent à peine commentée, alors qu'elle permettait d'établir une comparaison pertinente entre animaux et végétaux. La description de la méiose ne devait pas se limiter à une présentation schématique des divisions réductionnelle et équationnelle ; il était par exemple nécessaire de présenter la formation des chiasma pour expliquer correctement le principe des recombinaisons et de préciser que les kinétochores des chromosomes ne s'attachent pas de la même façon au fuseau mitotique selon que les cellules effectuent une mitose ou une première division de méiose.

Il était inutile de présenter de manière détaillée les mécanismes d'expression de l'information génétique (transcription, maturation des ARN et traduction) ; à ce titre, de nombreux candidats considèrent de manière surprenante que l'information génétique n'est exprimée qu'en phase G_1 , alors que de nombreuses synthèses protéiques se déroulent durant toute l'interphase (G_1 , S, G_2 et G_0) et dans de rares cas également en phase M. Une confusion a parfois été commise entre cycle cellulaire et cycles de vie des organismes, conduisant à de longs développements totalement hors

sujet. La même remarque peut être formulée à propos de la fécondation de l'œuf des Amphibiens et de l'établissement de l'axe dorso-ventral.

Dans les devoirs, la mitose était souvent restreinte aux cellules somatiques diploïdes, alors qu'elle concerne également des cellules haploïdes et les cellules germinales. Pour un certain nombre de candidats, la méiose conduit systématiquement à la production de gamètes, ce qui n'est pas vrai chez les végétaux (et chez certains animaux à cycle haplodiplophasique ou haplophasique) puisqu'elle donne des spores. Très souvent, l'anneau contractile est représenté à l'extérieur de la cellule alors qu'il est sous-membranaire. Dans de nombreuses introductions, les candidats prétendent qu'une particularité des cellules procaryotes par rapport aux cellules eucaryotes est l'absence de compartimentation, ce qui est inexact (exemple des thylacoïdes des cyanobactéries).

Enfin, quelques erreurs ont été sévèrement sanctionnées : séparation des chromosomes homologues lors de la mitose, séparation des chromatides sœurs lors de la première division de méiose, erreur d'orientation des brins d'ADN, confusion entre ADN mono- ou bicaténaire avec chromosome à une ou deux chromatides, entre origine de réplication et promoteur, entre réplication et transcription voire traduction, entre centromères et centrosomes, entre acides aminés et nucléotides...

En conclusion, de nombreux candidats n'ont pu valoriser le temps (trop important) qu'ils ont consacré à cette partie de l'épreuve (contenu mal délimité, connaissances trop superficielles, mauvaise compréhension des processus impliqués...). Cependant, le sujet a permis à certains de proposer des développements de qualité, répondant bien à la question posée, témoignant d'un véritable effort de synthèse, et s'appuyant sur des connaissances solides.

SUJET A : Contrôle de la mort programmée des cellules **par le facteur de transcription NFκB**

Pratiquement tous les candidats ont traité ce sujet, long mais relativement accessible, qui conduisait à élucider, étape par étape, les mécanismes moléculaires par lesquels le TNF active le facteur de transcription NFκB, puis à comparer les effets du TNF à ceux d'un agent anticancéreux, la doxorubicine.

Nous avons toutefois relevé un certain nombre d'erreurs de raisonnement fréquemment commises par les candidats. Dans les expériences d'immunodétection sur membrane (par exemple à la question 3), si le signal correspondant à une protéine attendue est absent, c'est que la protéine elle-même est absente et non qu'elle a changé de localisation ou de conformation, puisque les électrophorèses s'effectuent à partir des protéines totales, en conditions dénaturantes.

Pour répondre correctement aux questions 4 et 5, il était important de ne pas confondre protéines totales et protéines cytoplasmiques. Sous l'effet du TNF, la quantité totale de NFκB (nucléaire + cytoplasmique) présente dans les cellules demeure inchangée, tandis que la quantité de NFκB nucléaire augmente au cours du

traitement. Cela signifie que NFκB passe du cytoplasme dans le noyau et non que NFκB est synthétisé dans le noyau !

Dans une expérience d'électrophorèse, ce sont les molécules chargées, et non les molécules polaires, qui se déplacent sous l'effet du champ électrique (question 7). Même si cela n'apparaissait pas explicitement dans la formulation de la question 10, il était nécessaire de prendre en compte la piste 6 de l'électrophorégramme pour interpréter le profil présenté dans la piste 7. La modification de la migration de la sonde ne résultait pas d'un effet non spécifique lié à l'addition d'immunoglobulines dans le mélange d'incubation, mais dépendait de la présence d'anticorps dirigés contre NFκB, ce qui permettait de confirmer l'identité de la protéine associée à la sonde. Rappelons que les seuls complexes détectés sont ceux qui contiennent la sonde radioactive ! La représentation schématique d'un anticorps, et de son interaction avec un antigène, est apparue dans certains devoirs très fantaisiste.

Beaucoup de candidats ont eu du mal à distinguer ce qui se passe *in vivo*, dans les cellules avant l'extraction des protéines (stimulation des cellules par le TNF, entrée de NFκB dans le noyau, phosphorylation) et ce qui se passe *in vitro*, dans les mélanges d'incubation contenant les protéines extraites des cellules (liaison de NFκB à la sonde nucléotidique, interaction NFκB-anticorps). Ainsi, ce ne sont pas les protéines nucléaires extraites qui sont traitées par le TNF. Plus tard, à la question 29, c'est la translocation nucléaire de NFκB, induite par la doxorubicine dans les cellules intactes, qui est démontrée : elle a pour conséquence une augmentation de la quantité de NFκB présente parmi les protéines nucléaires extraites (mise en évidence d'après la capacité de la protéine à se lier à sa séquence cible d'ADN *in vitro*).

A notre grande surprise, très peu de candidats ont su représenter le mécanisme réactionnel mis en jeu lors de la phosphorylation de NFκB (question 13), qui faisait appel à des connaissances de base de chimie organique : même si elle ne fait pas intervenir un acide carboxylique, il s'agit en effet d'une simple réaction d'estérification. Pour répondre à la deuxième partie de la question 14, on peut suggérer que le gène *LUC* est faiblement transcrit en l'absence de NFκB actif (niveau de base) ou encore que NFκB non phosphorylé (s'il est muté en position 311, ou en l'absence de TNF) se fixe à l'ADN et stimule très faiblement la transcription, son pouvoir activateur étant considérablement augmenté après phosphorylation.

De nombreux candidats interprètent mal les expériences témoins de la figure 7 (question 16). Les protéines recueillies à l'issue de l'immunoprécipitation sont dénaturées avant d'être analysées par immunodétection sur membrane. Si le même anticorps est utilisé pour l'immunodétection et pour l'immunoprécipitation, un résultat positif confirme la présence de la protéine cible, il n'implique pas que cette protéine se dimérise. Une interaction entre p300 et NFκB est en revanche nécessaire pour que p300 soit immunodétectée après immunoprécipitation par un anticorps qui reconnaît NFκB, c'est-à-dire pour que p300 soit présente dans le mélange immunoprécipité par l'anticorps anti-NFκB (et réciproquement). Un certain nombre de candidats ont toutefois parfaitement compris les expériences de co-immunoprécipitation et d'immunoprécipitation de chromatine qui ne figurent pas parmi les plus simples.

A la question 18, certains candidats ont pensé à tort que le TNF induit de manière physiologique l'expression du gène de la luciférase, alors que ce dernier est en fait un gène rapporteur utilisé ici pour tester la capacité du TNF à induire tout gène cible comportant dans sa région régulatrice la séquence cible de NF κ B.

La détection de l'ARNm codant la GAPDH (question 19) ne démontre pas l'absence d'effet du TNF sur l'expression du gène correspondant, dont le texte précise qu'elle est constitutive, elle permet de vérifier que la même quantité d'ARN a été déposée dans les deux pistes, ce qui valide l'interprétation de l'effet du TNF sur l'expression du gène *BCL-XL*.

Les questions 21 à 23 étaient très ouvertes puisque l'état actuel des connaissances ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur les rôles multiples et complexes que peut jouer NF κ B de par son intervention dans de nombreuses voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaires. Leur but était d'évaluer l'aptitude des candidats à synthétiser les résultats recueillis pour en tirer quelques éléments de réflexion, en suivant simplement la logique des données fournies. L'étude menée ici permet de montrer que NF κ B, activé sous l'effet du TNF, induit l'expression du gène *BCL-XL* dont le produit inhibe l'apoptose. Chez les souris *NF κ B^{-/-}*, *BCL-XL* n'est pas produit, il manque un contrôle négatif de l'apoptose, ce qui explique les destructions tissulaires constatées. Cet effet est atténué si le gène *TNF* est également invalidé : cela signifie qu'en partie au moins l'apoptose observée est due à l'action du TNF. Le TNF agit donc comme un inducteur d'apoptose au cours du développement embryonnaire : durant l'élaboration de l'architecture de l'organisme, certaines cellules prolifèrent, certaines se différencient, tandis que d'autres doivent être éliminées par apoptose, permettant le remaniement de structures embryonnaires transitoires. Toutefois, le processus apoptotique doit rester limité et étroitement contrôlé pour ne pas devenir délétère, d'où l'importance, parallèlement à l'induction de l'apoptose par le TNF, de l'activation de NF κ B qui induit l'expression de gènes de survie (*BCL-XL*) inhibant l'apoptose.

Dans l'expérience décrite sur la figure 10 (question 24), la même quantité de cellules est présente dans tous les lots au temps zéro, les cellules sont traitées par différentes concentrations de doxorubicine pendant 24 heures et elles sont dénombrées à l'issue de ce traitement. Les cellules non traitées prolifèrent durant les 24 heures de l'expérience. Le fait que les cellules traitées soient moins nombreuses que les cellules non traitées au bout de ces 24 heures peut s'expliquer par deux types d'effets : soit des cellules meurent en présence de doxorubicine, soit leur prolifération est inhibée par la doxorubicine. Très peu de candidats ont pensé à cette seconde hypothèse.

Les questions 31 et 32 avaient pour finalité de comparer le rôle joué par NF κ B dans la réponse des cellules au TNF et à la doxorubicine. Ces deux agents activent NF κ B, par des mécanismes similaires mais avec des cinétiques différentes (comme le révèlent les échelles de temps des expériences décrites sur les figures 1 et 11). Toutefois, les conséquences de l'activation de NF κ B sont distinctes : en réponse au TNF, l'activation de NF κ B permet d'inhiber l'apoptose, tandis qu'en réponse à la

doxorubicine, l'activation de NFκB est associée à une inhibition de la prolifération cellulaire ou à l'induction de l'apoptose.

La confrontation des conclusions tirées des deux parties du sujet A permettait de mettre en évidence qu'un même facteur, ici NFκB, peut exercer des effets opposés, selon les cellules considérées et la nature du signal à l'origine de son activation.

SUJET B : Etude chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* de la réplication d'un ADN endommagé

L'analyse des documents permettait de mettre en évidence que la présence de lésions dans l'ADN est à l'origine de l'apparition de mutations. L'étude permettait dans un premier temps d'analyser *in vitro* l'impact de la présence d'une lésion (site abasique) sur la fidélité de la réplication. Dans un deuxième temps, l'intervention des mêmes mécanismes *in vivo* était démontrée par la comparaison des taux de mutagenèse obtenus avec différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*, sauvage et mutantes.

La partie B1 a été discriminante dans la mesure où beaucoup de candidats n'ont pas compris les conditions expérimentales (notamment le rôle des amorces et du brin matrice) et n'ont pas répondu correctement à la question 33. Ainsi, l'espèce moléculaire I correspondait à la sonde A1* et non à l'ADN S1 (puisque les brins avaient été séparés par chauffage) ou à une protéine. L'espèce moléculaire II (fragment d'ADN simple brin de 75 nucléotides) correspondait au brin complémentaire de M1 obtenu par polymérisation à partir du fragment A1*. Certains candidats n'ont pas compris que seules les molécules radioactives (A1* ou les produits obtenus par élongation de A1*) sont détectées par autoradiographie.

Beaucoup de candidats, ne prenant pas le temps d'analyser en détail la figure 16, n'ont pas noté qu'en présence de Pol α et d'une matrice comportant un site abasique en position 45 (à partir de son extrémité 3'), un fragment de 45 nucléotides était obtenu. Cette observation était pourtant déterminante pour comprendre la coopération entre les ADN Pol α et β au niveau d'un site abasique, Pol α est capable d'ajouter un nucléotide face au site abasique mais reste bloquée (obtention d'un fragment de 45 nucléotides). Pol β est ensuite capable de reprendre l'élongation à partir de ce point et d'achever la réplication du brin matrice (obtention d'un fragment de 75 nucléotides).

Les réponses à la question 40 ont été décevantes : les candidats ont souvent été incapables de mobiliser leurs connaissances théoriques sur la définition et les méthodes de détermination des paramètres V_{max} et K_M pour les appliquer à un cas concret.

Bien que la partie B4 ait été en général bien traitée, certains candidats n'ont pas su d'emblée prédire la sensibilité à la canavanine des cellules CAN⁺ (sensibles à la canavanine) et des cellules CAN⁻ (résistantes à la canavanine) ; ils étaient ensuite

incapables d'interpréter correctement l'effet du MMS sur les différentes souches analysées.

Dans les parties B4 à B7, il était nécessaire, même si cela n'était pas explicitement demandé, de calculer les différents taux de mutagenèse avant de procéder aux interprétations.

Les questions 49 et 50 ont révélé que beaucoup de candidats ne savent pas déterminer la séquence d'acides aminés correspondant à la séquence d'un gène, et confondent brin codant et brin matrice. Chez les mutants 1 et 2, la substitution d'une base entraînait soit une mutation ponctuelle (mutant 1) dont on pouvait déduire qu'elle altère la fonction du transporteur, soit une mutation non sens (mutant 2) qui entraînait la synthèse d'une protéine tronquée. Chez le mutant 3, un nucléotide manquait alors que chez le mutant 4, un nucléotide surnuméraire était présent : dans chacun de ces deux cas, le cadre de lecture était décalé, ce qui conduisait à la synthèse d'une protéine tronquée (présence d'un codon stop dans le nouveau cadre de lecture). L'analyse du mutant 1 montrait que la partie N-terminale de la protéine est importante pour la fonction du transporteur, mais les résultats obtenus avec les mutants 2 à 4 indiquaient qu'elle n'est pas suffisante.

En conclusion, cette partie, plus difficile que les autres, a été bien traitée par un nombre restreint de candidats ; le plus souvent, les candidats ont correctement traité soit la partie biochimique (questions B1 à B3), soit la partie génétique (questions B4 à B7).

SUJET C : Réponses induites par les rayons ultraviolets chez l'Homme

L'étude présentée permettait de comprendre les mécanismes de transduction du signal intervenant lors d'un stress génotoxique induit par les rayons UV. Elle permettait de mettre en évidence, dans un premier temps, le rôle de « récepteur » ou « senseur » joué par la protéine kinase ATR, dont l'activité augmente significativement lors de sa fixation à un ADN comportant un dimère de thymine. Dans un deuxième temps, l'étude permettait de mettre en évidence le contrôle exercé par ATR sur la dégradation de la protéine p21, et ses conséquences sur le recrutement du facteur PCNA au niveau des sites endommagés. Il était également montré que la protéine p53 est phosphorylée par ATR lors d'un stress génotoxique, mais l'implication de p53 dans le contrôle de l'activité de p21 n'était pas prouvée, ce qui permettait aux candidats de proposer plusieurs hypothèses. La démarche expérimentale confrontait les candidats à des méthodes actuelles de biochimie et de biologie cellulaire utilisées pour l'étude de cellules animales.

A la question 54, la moitié des candidats n'ont pas dégagé de l'énoncé deux points essentiels. Il était tout d'abord important de souligner que les nucléotides libres étant éliminés, seuls les nucléotides polymérisés étaient présents au moment de l'autoradiographie. Ensuite, les expériences étant menées en présence

d'hydroxyurée dès le début du traitement aux rayons UV, seuls les processus de réparation conduisaient à l'incorporation de nucléotides radioactifs dans l'ADN.

La réponse à la question 60 était souvent lapidaire, alors qu'elle nécessitait une analyse étape par étape. Il était tout d'abord nécessaire d'évaluer, pour chaque type de molécules d'ADN (endommagées ou non), la fixation non spécifique (*i.e.* la radioactivité mesurée en l'absence de protéine ATR), correspondant à une fixation des acides nucléiques sur les billes ou les anticorps. Pour calculer la radioactivité liée *spécifiquement* à la protéine ATR, il était ensuite nécessaire de soustraire à la radioactivité obtenue en présence d'ATR celle correspondant à la fixation non spécifique. Ce n'était qu'à ce moment que l'on pouvait conclure quant à la fixation de la protéine ATR sur l'ADN endommagé ou non. Il était nécessaire de rappeler que les deux types de molécules d'ADN présentaient la même radioactivité spécifique, et que la radioactivité mesurée rendait donc directement compte de la quantité d'ADN fixée à la protéine ATR.

A la question 68, les images d'immunofluorescence permettaient de localiser p21 dans le noyau (couleur jaune) et dans le cytoplasme (couleur verte); l'observation d'une localisation nucléaire n'autorisait pas à conclure que p21 est associée à l'ADN.

La partie C8 a parfois été mal interprétée, notamment parce que certains candidats n'ont pas compris que l'immunodétection sur membrane permettait de visualiser à la fois la protéine p21 endogène (bande p2) et la protéine recombinante (bande p1), de migration plus lente du fait de l'étiquette HA (p21-HA ou p21K6R-HA).

La question 72 permettait de conclure que la protéine PCNA n'est recrutée au niveau des sites endommagés (pour permettre leur réparation) que lorsque la protéine p21 est dégradée. Certains candidats en sont donc arrivés à l'interprétation plausible selon laquelle la protéine p21 séquestre la protéine PCNA, et la dégradation de p21 induite par les UV permet la libération de PCNA et sa fixation au niveau des lésions de l'ADN.

En conclusion, le sujet C abordait, dans un autre contexte expérimental, le thème décliné dans le sujet B ; il était cependant plus facile, et c'est le plus souvent en raison d'une analyse trop rapide de l'énoncé qu'il a été mal traité.