

Rapport de l'épreuve écrite de biologie

École : ENS de Cachan, Lyon et Paris, ENPC

Coefficients :

Cachan : 8 (total concours 63)

Lyon : option biologie 8, option sciences de la terre 4 (total concours 58,5)

Paris : option biologie 7, option géologie 4 (total concours 142)

ENPC : 4 (total concours 80)

Membres du jury :

N. Alazard-Dany, A. Bessis, S. Bury-Mone, D. Busti, E. Guillaume, S. Hermann-Ledenmat, C. Journo, R. Proville, P. Rialland-Lefevre.

L'épreuve de biologie de cette année, d'une durée totale de 6 h, comportait un sujet de synthèse d'une durée conseillée de 2 h ainsi que deux sujets d'analyse de documents d'une durée conseillée de 2 h chacun, construits autour d'une thématique commune : la fécondation.

Pour cette épreuve, les candidats ont globalement su faire preuve d'une bonne gestion de leur temps de composition puisqu'ils ont obtenu en moyenne des notes équivalentes dans chacune des parties. Le jury regrette cependant que certains d'entre eux n'aient pas eu le temps de terminer leur devoir de synthèse. Par ailleurs, ceux qui ont présenté un devoir partiellement rédigé ont été pénalisés.

Les sujets d'analyse, qui étaient cette année en lien direct avec des thématiques du programme, ont permis de bien sélectionner les candidats :

- le sujet A ('Etude des interactions pollen-pistil chez le Coquelicot') a été très largement abordé, à l'exception des dernières questions plus difficiles d'électrophysiologie (questions 10 à 15). Environ la moitié des candidats n'ont pas réussi à franchir ce saut de difficulté, ce qui a rendu ce sujet particulièrement discriminant ;
- le sujet B ('Identification d'acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris'), plus accessible, a été très largement abordé mais très peu de candidats ont correctement traité les dernières questions, en particulier la question 29 qui demandait de confronter les conclusions de plusieurs expériences pour discuter du rôle potentiel de deux protéines dans la fécondation.

Comme chaque année, le jury souhaite donner quelques conseils pour **les sujets d'analyse** :

- **Lisez bien l'énoncé** (y compris les légendes de figure) de façon à ne pas laisser de côté des informations indispensables pour une bonne interprétation des résultats. Par exemple, à la question 18, très peu de candidats ont su calculer la taille des fragments a et b parce qu'ils n'ont pas compris que seuls les ADN capables de s'hybrider avec la sonde radioactive étaient révélés ;
- **Soyez le plus concis possible** dans vos réponses. Il ne sert à rien de rédiger un paragraphe introductif pour chacun des sujets avec documents, de rappeler systématiquement les conditions expérimentales ou de « paraphraser » simplement des figures en dehors d'une véritable démarche d'analyse ou d'argumentation (par exemple : « sur la piste d'électrophorèse X, on voit une tâche... ») ;
- Lorsque vous décrivez une expérience témoin, **comprenez et expliquez bien en quoi l'expérience en question sert de contrôle pour l'expérience test**. Par exemple, à la question 1, l'étude du niveau d'expression du gène ubiquiste *GAPDH* (dont l'expression ne varie pas d'un tissu à l'autre) permet de s'assurer que la même quantité d'ARN a été déposée dans chaque puits au moment de l'électrophorèse (contrôle de charge) et d'interpréter les différences d'intensité de radioactivité d'une piste à l'autre lors de l'expérience test comme des variations du niveau d'expression des gènes *PrpS₁/PrsS₁* (et non de la quantité d'ADN déposé). Le jury a constaté cette année que la grande majorité des candidats ne savait pas analyser une expérience contrôle ;
- Dans le même ordre d'idée, le jury conseille d'**analyser l'ensemble des conditions qui sont présentées dans une expérience** en procédant méthodiquement, condition après condition. Chaque condition apporte en effet des informations spécifiques qu'il convient de dégager. Vous montrerez ainsi que vous êtes rigoureux dans votre analyse. Par exemple, à la question 5, la majorité des candidats a ignoré une partie des conditions présentées dans la figure 5, alors que chacune apportait des précisions importantes ;
- **Utilisez un vocabulaire précis et adapté** lorsque vous analysez un document. Dire qu'un gène est « impliqué dans » ou « intervient dans » ou « a un rôle dans » n'a pas la même signification que « est nécessaire à » ou « est nécessaire et suffisant à ». Si par exemple chez un mutant CD9^{-/-}, une fonction est perdue alors CD9 est nécessaire à la fonction, ce qui est plus précis que « il intervient dans la fonction ». De la même manière, dire qu'une protéine

est « membranaire » n'a pas la même signification que de dire qu'elle est « transmembranaire » (voir question 2). Dans les réponses à la question 16, le jury a souvent noté un vocabulaire pauvre et approximatif pour décrire les clichés d'ovocytes de la figure 11 : beaucoup de candidats ont eu du mal à définir les 2 pôles d'un ovocyte et les microvillosités ont souvent été nommées avec des termes imprécis ou impropres : poils, aspérités, évaginations, invaginations, protubérances, villosité (pour n'en citer que quelques-uns). Nous rappelons que le jury accorde une grande importance à la rigueur scientifique et au choix des termes utilisés, et qu'il en tient compte dans son barème ;

- **Aidez-vous davantage des barres d'échelle** afin de ne pas faire d'erreurs d'interprétation. Par exemple, un nombre non négligeable de candidats conclut à partir de l'étude des clichés de microscopie électronique à balayage des figures 11 et 12 que l'on visualise directement la protéine CD9 (voire le domaine extracellulaire de CD9 !) en lieu et place des microvillosités. De même, les candidats n'utilisent pas les barres d'échelle de la figure 6 pour proposer des hypothèses plausibles quant à l'origine du calcium cytosolique observé suite à l'interaction d'un grain de pollen avec des protéines PrpS incompatibles ;
- Lorsque certaines questions font appel à vos connaissances, **sachez faire le lien entre ce que vous savez et les conclusions déduites des résultats expérimentaux**. Par exemple, le jury a été surpris qu'aussi peu de candidats arrivent à déduire des expériences du sujet A que les protéines PrpS et PrsS intervenaient dans un mécanisme d'auto-incompatibilité pollen-pistil de type gamétophytique. De même, certains candidats n'ont pas su interpréter le test de fusion entre un ovule et un spermatozoïde de la question 22 alors qu'ils ont su parfaitement retranscrire les étapes de la fécondation dans le sujet de synthèse ou dans la question précédente (question 21) ;
- Pour le commentaire des résultats expérimentaux, nous recommandons aux candidats de suivre le schéma classique suivant : **(1) analyse des résultats, (2) interprétation des résultats, (3) conclusions (notamment s'il y a plusieurs figures) et éventuellement (4) énoncé d'hypothèses explicatives**. Le jury insiste lourdement sur le fait que l'analyse des résultats ne doit pas se limiter à une simple description du document (cf. remarque ci-dessus). Par exemple, si une valeur passe de 20 à 40, on s'attend à ce que le candidat puisse dire qu'elle était à 20 et qu'elle a doublé ;
- **Maîtrisez mieux les techniques de base de biologie, tant dans leur protocole que dans leur principe**. Même si les sujets sur documents amènent il est vrai tous les éléments nécessaires à la compréhension et à l'interprétation des figures, il est évident qu'une meilleure connaissance des techniques classiques de biologie (par exemple dans ce sujet : western blot, systèmes d'expression hétérologues, ARN anti-sens, patch clamp...) permettrait aux candidats de mieux comprendre les documents et de gagner en rapidité. Sur ce point, une manière de progresser consiste à s'exercer sur des sujets d'annales tout en s'aidant des rapports de jury ;
- **Enfin, soignez la syntaxe et la ponctuation et, pour ceux qui ont une écriture petite, faites un effort particulier pour que celle-ci reste lisible**. Même avec la meilleure volonté du monde, il est arrivé que le jury se trouve dans l'incapacité de lire certains mots voire même de comprendre le sens de certaines phrases, ce qui est toujours pénalisant.

Pour le reste, nous souhaitons saluer les efforts d'analyse et d'interprétation des résultats de certains candidats avec des données chiffrées à l'appui. De plus, la grande majorité des candidats savent discuter de la significativité des résultats à partir des barres d'erreur, ce qui est un point très positif !

Sujet de synthèse – La fécondation

Ce sujet demandait aux candidats de mobiliser des connaissances dispersées dans le programme de cours de BCPST (points 4.1 –Reproduction sexuée des végétaux (Angiospermes et Filicophytes), 4.2 –Reproduction sexuée chez les Mammifères (gamètes et fécondation), 4.4 –Mécanismes favorisant l'hétérozygotie– et, dans une moindre mesure, le point 3.1 – Acquisition du plan d'organisation de la Grenouille), de les rassembler et de les organiser en un ensemble cohérent. Signalons que quelques rares candidats se sont appuyés sur des exemples vus exclusivement dans le programme de travaux pratiques (champignons, algues, Polytric, Pin). Comme les connaissances relatives à cette partie du programme de TP ne sont pas exigibles en dehors d'une activité d'observation, le jury les a valorisées par des bonus.

La délimitation du sujet n'a globalement pas posé de problèmes. Cependant quelques candidats se sont livrés à de larges hors sujet (parmi lesquels : gamétogenèse chez les Mammifères, sporogenèse et étapes de formation du pollen et du sac embryonnaire chez les Angiospermes, étapes de la formation des archégones et des anthéridies chez le Polypode, mécanisme de déhiscence des anthères, étapes et mécanismes de la méiose) alors que d'autres n'ont pas pensé à traiter certains aspects du sujet (place de la fécondation dans les cycles de développement, lien entre le type de fécondation – interne / externe – et le milieu de vie, conséquences génétiques et développementales de la fécondation, contrôle de la fécondation chez les Angiospermes, etc.). Le jury a regretté que beaucoup d'entre eux se soient limités aux seuls Angiospermes et Mammifères alors qu'il était possible d'exploiter l'exemple du Polypode (pour illustrer la diversité des éléments fécondants chez les végétaux et un mécanisme de rapprochement des gamètes par chimiotactisme) ou celui de la Grenouille (comme exemple de fécondation externe ou du rôle de la fécondation dans la détermination des futurs axes de polarité).

De manière générale, nous tenons à saluer pour ce sujet le niveau de connaissances des candidats sur les mécanismes moléculaires de la fécondation, ainsi que la qualité de présentation des devoirs. Les plans proposés étaient souvent corrects quand ils ne se limitaient pas à « I/ La fécondation des Angiospermes » et « II/ La fécondation chez les Mammifères ». Le jury souhaite cependant formuler quelques critiques et suggestions pour encore améliorer la qualité des devoirs de synthèse :

- **Le jury a regretté que beaucoup de candidats ne se soient pas appuyés sur des exemples concrets** pour étayer leur discours. Autant que possible, le jury recommande de commencer la rédaction d'un paragraphe par des faits précis d'observation ou des résultats d'expérimentation pour ensuite tirer des conclusions et donner des généralisations. Cette démarche démonstrative pouvait notamment s'appliquer pour illustrer les mécanismes favorisant l'allogamie/autogamie chez les Angiospermes (ex. coadaptation plante-insecte dans la pollinisation des orchidées, déhiscence explosive des fleurs de Genêt à balais, étamines à bascule de sauge, étamines irritables d'Épine-Vinette assurant le dépôt de pollen sur l'insecte / fleurs cléistogames de Violette, étamines surplombant le stigmate d'*Arabidopsis*...) ou pour illustrer les principales stratégies empêchant (ou limitant) l'autogamie chez les Angiospermes : auto-incompatibilités pollen-pistil (Chou, Solanacées), dioécie (Compagnon blanc et Compagnon rouge, Houblon, Salicacées,...), protogynie (Arums, Aristoloches...), protandrie (Lamiacées...), barrières spatiales (rostellum des orchidées...). Le jury insiste sur le fait qu'une argumentation basée sur un (ou quelques) exemple(s) précis et judicieusement choisis est toujours préférable à un long discours théorique ;
- **Si la plupart des candidats pensent à établir une comparaison entre plusieurs modalités de fécondation, celle-ci est souvent peu poussée** et la notion d'élément fécondant ne ressort pas assez. Par exemple, chez les Angiospermes la réception de l'élément fécondant mâle (grain de pollen) et le contrôle de la spécificité s'effectue au niveau du pistil, alors que chez les Mammifères ces deux phénomènes s'effectuent au niveau des gamètes. De la même manière, il était possible de mettre en parallèle le franchissement des tissus du style/ovule par le tube pollinique des Angiospermes avec le franchissement de la zone pellucide de l'ovocyte par le spermatozoïde via la réaction acrosomique ;
- **Le jury attendait également un certain nombre de données expérimentales intégrées dans une démarche démonstrative.** Ce type de démarche pouvait typiquement être utilisé pour définir et comparer les auto-incompatibilités (homomorphiques) gamétophytique et sporophytique chez les Angiospermes. Or, trop souvent, les auto-incompatibilités ont été traitées de manière décevante : les candidats se sont contentés de donner des définitions (parfois fausses ou incomplètes). Signalons au passage que l'hétéroflorie chez la Primevère, qui a souvent été citée comme un exemple classique d'auto-incompatibilité hétéromorphique, est avant tout un dispositif anatomique de la fleur favorisant l'allogamie (voir à ce sujet l'article téléchargeable en ligne de Spencer Barrett, *The evolution of plant sexual diversity*, pour le mécanisme de transfert croisé du pollen entre fleurs longistylées et brévistylées) ;

- **Le jury souhaite mettre en garde les candidats sur le sens de certaines phrases et l'emploi des termes scientifiques.** Dire que la méiose « donne » quatre gamètes n'a en soi pas de sens. Les « cryptogames » ne sont pas les végétaux à ovules nus et c'est par ailleurs un terme vieilli (anciennement, ce groupe rassemblait les bryophytes *sensu lato* et les ptéridophytes par opposition aux phanérogames ou spermaphytes). Certains candidats croient que le gamète femelle ne peut jamais être libéré (ce qui n'est pas le cas chez la Grenouille, le Fucus et l'Ulve par exemple), ce qui les amène à définir les fécondations externe et interne selon que les gamètes mâles se déplacent ou non dans le milieu extérieur (ex. pellicule d'eau chez le Polypode). En réalité, la fécondation des Filicophytes, des Angiospermes et des Mammifères sont des exemples de fécondation interne (gamète femelle non libéré) alors que chez la Grenouille (et beaucoup d'algues) la fécondation est externe. Le jury a remarqué que les candidats n'employaient qu'assez rarement les termes de plasmogamie (fusion des membranes des gamètes) et de caryogamie/amphimixie (fusion/réunion des noyaux) alors qu'ils décrivent pourtant ces deux étapes clés de la fécondation proprement dite. A la place, ils ont utilisé plus généralement le terme de fusion pour désigner indifféremment la fusion des membranes et celle des noyaux. Enfin, les copies qui présentent des fautes d'orthographe grossières dans le vocabulaire scientifique ou courant ont toujours donné une mauvaise impression générale. En voici quelques exemples : épandyme au lieu d'épididyme, phyllicophytes au lieu de Filicophytes (dans plusieurs copies), insectes au lieu d'insectes, mal au lieu de mâle (dans plusieurs copies), femmel au lieu de femelle (dans plusieurs copies), aploïde au lieu de haploïde...
- **Certains devoirs manquaient cruellement de soin.** Pour certaines copies également, les dessins étaient trop schématiques (ex. spermatozoïdes dénués de tout « hydrodynamisme »), sans échelle ou entachés d'erreurs ;
- **Les introductions manquent souvent de pertinence et d'originalité.** Dans certaines copies, elles se résument à une juxtaposition d'affirmations qui les font plus ressembler à des conclusions. Par ailleurs, il ne suffit pas de dire que « la fécondation est importante, et nous étudierons les acteurs et les modalités » pour faire une introduction. Il ne suffit pas non plus d'écrire une phrase sous forme de question pour estimer que « la question » dont on traitera a été posée. Rappelons que l'introduction doit expliquer le sujet (sans toutefois le déflorer) pour dégager une problématique qui annonce et justifie le plan ;
- **La conclusion, enfin, doit répondre de manière argumentée à la problématique et mettre le sujet en perspective avec une « ouverture » du sujet.** Pour ce sujet, plusieurs ouvertures étaient possibles : comparaison de la reproduction sexuée avec d'autres modes de reproduction, questions éthiques autour de la fécondation *in vitro* chez l'Homme, etc. Cette partie trop souvent sous-estimée par les candidats ne doit pas être négligée : elle manifeste la capacité de synthèse et de prise de recul du candidat, elle est aussi l'occasion de manifester sa curiosité et sa culture personnelle.

Sujet A – Etude des interactions pollen–pistil chez le Coquelicot

Ce sujet avait pour objectif de mettre en évidence le rôle de deux déterminants du locus S (*PrpS* et *PrsS*) dans le phénomène d'auto-incompatibilité pollen-pistil chez le Coquelicot.

La question 1, qui ne posait aucune difficulté particulière, a presque toujours été bien réussie sauf l'analyse de l'expérience contrôle avec *GAPDH* (voir remarque ci-dessus). Les résultats de la figure 1 indiquent que les gènes *PrsS₁* et *PrpS₁* s'expriment spécifiquement au niveau du stigmate et du pollen et que leur niveau d'expression augmente au cours de la maturation du stigmate et de l'anthere, respectivement.

La question 2, qui avait pour objectif de tester la rigueur d'analyse et la capacité d'argumentation des candidats sous l'angle d'une discussion autour de la localisation subcellulaire de la protéine PrpS₁, s'est montrée beaucoup plus discriminante. Il est surprenant que la majeure partie des candidats ne se soient pas appuyés sur les modèles de structure de PrpS₁ pour déduire qu'il s'agit vraisemblablement d'une protéine transmembranaire. D'autres ont essayé à tort de trancher entre les deux modèles de structure en s'appuyant sur les résultats de western blot de la figure 3A. En réalité, les expériences de western blot, réalisées en présence ou non de Triton X-100 (un détergent utilisé ici pour enrichir les extraits protéiques en protéines membranaires), confirment que PrpS₁ est bien une protéine associée aux membranes cellulaires sans toutefois démontrer qu'elle est transmembranaire (ce pourrait être une protéine à ancrage GPI...) et, encore moins, qu'elle possède un domaine intracellulaire libre ! Enfin, l'expérience d'immunolocalisation permet de préciser que la protéine s'exprime majoritairement et de manière uniforme au niveau de la membrane plasmique du tube pollinique. Au final, beaucoup de candidats ont déduit que la protéine PrpS₁ était une protéine transmembranaire en s'appuyant sur les résultats de western blot sans évoquer les modèles de prédiction qui seuls permettaient d'avancer cette hypothèse.

Les tests de germinations (questions 3 et 4) avaient pour but de mettre en évidence le rôle biologique des PrsS et PrpS. Dans la réponse à la question préliminaire, il est surprenant que beaucoup de candidats ne savent pas ce qu'est une protéine recombinante, c'est-à-dire une protéine produite par la technologie de l'ADN recombinant (par clonage du gène correspondant dans un plasmide, transfection du plasmide dans des cellules, expression du gène et enfin purification des protéines d'intérêt) et pas une protéine de fusion ! Le problème méthodologique soulevé par l'utilisation de protéines PrsS recombinantes produites chez la levure (qui au passage n'est pas une bactérie !) tient à

leur repliement et leur glycosylation qui diffèrent des glycoprotéines stigmatiques naturelles correspondantes, ce qui peut avoir des conséquences structurales pouvant altérer leur fonctionnalité. Les résultats de la table 1 montrent que la protéine PrpS₁ utilisée seule induit une inhibition de la germination des pollens issus de plantes exprimant l'allèle S₁ d'environ 50% alors qu'elle ne présente aucun effet significatif sur la germination de pollens n'exprimant pas cet allèle, ce qui montre un effet spécifique. Les résultats de la figure 4 vont dans le même sens avec cependant une inhibition de la germination des grains de pollen S₁S₃ presque deux fois plus forte en présence de PrsS₁ et PrsS₃ qu'en présence de PrsS₁ seul. Les résultats des expériences de germination menées avec ou sans le peptide PrpS₁ ou le peptide de séquence aléatoire (peptide contrôle) montrent que le peptide PrpS₁, mais pas le peptide contrôle, est capable de lever partiellement l'inhibition de la germination induite par PrsS₁ et PrsS₃, suggérant que PrsS₁ soit capable d'inhiber spécifiquement la germination des pollens S₁ en interagissant spécifiquement avec la boucle extracellulaire de 35 acides aminés de la protéine PrpS₁. Environ la moitié des candidats ne sont pas arrivés à établir que l'inhibition de la germination des pollens S₁ nécessite une interaction directe entre PrpS₁ et PrsS₁ via la boucle extracellulaire de 35 acides aminés et, parmi ceux-ci, quelques-uns déduisent à tort que la protéine PrpS₁ est indispensable à la croissance du tube pollinique. Au total, il apparaît que les protéines PrsS et PrpS sont vraisemblablement les déterminants femelle (ligand) et mâle (récepteur) impliqués dans l'auto-incompatibilité pollen-pistil chez le Coquelicot. Etant donné que PrsS₁ induit environ 50% d'inhibition de la germination du pollen issu de plantes S₁S₃ ou S₁S₆ (table 1), on pouvait proposer que les protéines PrsS et PrpS sont impliquées dans une auto-incompatibilité de type *gamétophytique*. De manière assez surprenante, très peu de candidats ont su déduire le type d'auto-incompatibilité alors qu'il s'agit d'une simple application du cours. Par ailleurs, aucun candidat n'a su remettre en cause au travers des résultats expérimentaux l'idée selon laquelle l'auto-incompatibilité de type gamétophytique est associée à une inhibition de la croissance du tube pollinique dans le style (et non à une inhibition de la germination du grain de pollen).

La question 5 a été traitée de manière hétérogène par les candidats dans la mesure où certains ne connaissent pas l'effet de l'addition d'oligonucléotides antisens sur le fonctionnement cellulaire et dans la mesure où d'autres n'arrivent pas à interpréter correctement les expériences contrôles. Les oligonucléotides antisens ont été utilisés dans le but de bloquer la traduction des protéines PrpS et, par là-même, leur expression à la surface des grains de pollen. Les résultats montrent que les protéines PrsS incompatibles induisent une forte inhibition de la croissance des tubes polliniques (l'inhibition est d'environ 80% aussi bien pour les pollens de plantes S₁S₃ que S₃S₈). Comme attendu, l'inhibition de l'expression des protéines PrpS (conditions 'as-PrpS_{1/8}') n'a aucune conséquence sur la croissance des tubes polliniques en dehors de toute stimulation par des protéines PrsS incompatibles, démontrant ainsi que l'effet d'inhibition de la croissance pollinique observé passe bien par l'interaction entre PrsS et PrpS. L'addition de l'oligonucléotide antisens as-PrpS₁ permet de lever partiellement l'inhibition de la croissance des tubes polliniques de grains de pollen S₁S₈ (la levée d'inhibition est d'environ 14% alors qu'elle est théoriquement de 50%). Cet oligonucléotide a bien un effet spécifique puisqu'aucune levée d'inhibition de la croissance n'est observée avec l'oligonucléotide sens s-PrpS₁. Enfin, les mêmes résultats sont obtenus avec l'oligonucléotide antisens as-PrpS₈ sur les grains de pollen de plantes S₃S₈, mais avec cependant une levée d'inhibition un peu plus forte (environ 22%). L'ensemble de ces résultats montre que les protéines PrpS jouent un rôle crucial dans les phénomènes d'auto-incompatibilité pollen-pistil et que leur action est S spécifique.

Les questions 7 à 9 permettaient d'étudier le rôle du calcium cytosolique dans le phénomène étudié. La plupart des candidats ont largement abordé ces questions mais seuls les plus rigoureux sont arrivés à construire un modèle explicatif complet et cohérent du mécanisme de libération du calcium. En présence de protéines PrsS incompatibles, on observe à la figure 6 un arrêt de la croissance du tube pollinique corrélativement à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique (détectée par le calcium green-1) qui apparaît à environ 100µm de l'extrémité de l'apex et qui semble se propager transitoirement en direction de l'apex du tube pollinique. En comparant ce résultat au cliché de la figure 6A, on constate que la libération initiale de calcium s'effectue à partir de la région nucléaire du tube pollinique, laquelle est associée à un abondant réticulum endoplasmique, suggérant que le calcium soit libéré à partir de ce même réservoir et non de la vacuole comme beaucoup de candidats l'ont proposé (voir remarque ci-dessus concernant la lecture des barres d'échelle). En revanche, la croissance du tube pollinique se poursuit en absence de traitement de même qu'en présence de protéines PrsS compatibles, et aucune variation de la concentration en calcium dans le tube pollinique n'apparaît. On pouvait ainsi proposer qu'en présence de protéines incompatibles, le calcium provoque une inhibition de la croissance du tube pollinique à son extrémité. A la figure 7, on observe suite à la libération d'IP₃ dans le cytosol induite par les UV une soudaine augmentation de la concentration en calcium cytosolique dans le tube pollinique à environ 100µm en arrière de l'apex suivie de la propagation rapide d'une vague calcique en direction de l'extrémité du tube pollinique à la vitesse d'environ 2µm/s, suggérant qu'une fois activé l'IP₃ provoque la libération de Ca²⁺ dans le cytosol à partir de réservoirs intracellulaire (vraisemblablement le réticulum endoplasmique puisque celui-ci est abondant dans la région nucléaire). En revanche, l'addition de néomycine (un inhibiteur de la phospholipase C) bloque toute libération du calcium dans le cytosol, ce qui montre que cette enzyme est nécessaire pour produire l'apparition d'une vague calcique au sein du tube pollinique et que l'apparition de cette vague calcique résulte d'un phénomène d'amplification. Les expériences présentées à la figure 8 permettent effectivement de mettre en évidence une activité de type phospholipase C elle-même dépendante de la concentration en calcium dans le cytosol. L'ensemble des résultats permettaient de proposer le modèle suivant : la libération initiale de calcium dans le cytosol de la région nucléaire du tube pollinique à environ 100µm en arrière de son extrémité augmenterait (localement) l'activité de la

phospholipase C, qui à son tour provoquerait la libération supplémentaire de calcium intracellulaire à partir de réservoirs intracellulaires (réticulum endoplasmique) par l'intermédiaire de la voie de l'IP₃. La répétition de ce mécanisme de proche en proche associé à la diffusion du calcium dans le cytosol assurerait la propagation de la vague calcique.

La dernière partie du devoir (questions 10 à 15), plus difficile, présentait les résultats d'expériences d'électrophysiologie (patch clamp et voltage ramp) avec comme but d'étudier les variations de conductance membranaire de protoplastes de grain de pollen en présence ou non de protéines PrsS incompatibles, et d'identifier un ou plusieurs canaux ioniques de la membrane du tube pollinique impliqué(s) dans l'auto-incompatibilité pollen-pistil. Les questions 10 et 11 se sont révélées à la fois très discriminantes et décevantes dans la mesure où extrêmement peu de candidats ont été capables, d'une part, de donner une formule correcte du potentiel d'équilibre ($E_{eq}^{\circ} = (V_{int} - V_{ext})_{eq} = RT/(zF) * \ln ([C]_{ext}/([C]_{int}))$) et, d'autre part, d'en faire des applications numériques justes à l'aide des courbes de logarithme népérien fournies. Des erreurs de signe ont souvent été constatées soit parce que les candidats n'ont pas tenu compte de la charge de l'ion ($z = -1$ pour les ions chlorures) soit parce que le rapport ($[C]_{ext}/([C]_{int})$) était inversé. De manière surprenante aussi, beaucoup de candidats n'arrivent pas à faire l'application numérique visiblement parce qu'ils ne savent pas arrondir. Les applications numériques donnent des valeurs de potentiel d'équilibre pour le calcium (136mV) et pour les ions chlorure (40 mV) bien supérieures au potentiel transmembranaire ($E = -100mV$), d'où un influx spontané d'ions calcium dans le protoplaste ou un efflux d'ions chlorure hors du celui-ci (en supposant la membrane perméable à ces ions). L'analyse de la courbe de la figure 9B montre que l'addition dans le milieu extracellulaire de protéines PrsS_{3/8} incompatibles provoque un courant d'intensité négative de grande amplitude (environ 60 pA) par rapport à la première partie de courbe (20pA) obtenue à partir des mêmes protoplastes non traités. Compte tenu des potentiels d'équilibre des ions calcium et chlorure calculés précédemment, on peut proposer que cette modification de conductance est attribuable soit à l'ouverture de canaux à calcium (avec un influx d'ions calcium) soit à l'ouverture de canaux à chlorure (avec un efflux d'ions chlorures). On note par ailleurs que la modification de conductance membranaire induite par les protéines PrsS est réversible (figure 9B), dose-dépendante (figure 9C), S-spécifique (figure 9D) et dépendante d'une conformation tridimensionnelle intacte (figure 9E).

Les résultats de voltage ramp qui suivent (rarement analysées par les candidats) permettaient de trancher entre les deux hypothèses précédentes (questions 12 à 14). Les expériences de la figure 10B montrent que, dans des conditions non traitées, le courant varie progressivement de +10pA à -110pA lorsque le voltage varie de manière linéaire de +10 à -180 mV. L'addition de protéines PrsS_{3/8} incompatibles dans le milieu provoque un courant d'intensité négative de même allure que dans les conditions non traitées mais celui-ci est d'autant plus fort que la membrane est hyperpolarisée (par exemple -300pA pour un potentiel transmembranaire de -180mV), d'où une courbe d'intensité-voltage non linéaire (figure 10C). Plusieurs hypothèses pouvaient être avancées pour expliquer la non-linéarité de la courbe. En voici deux : (1) le courant induit par PrsS_{3/8} pourrait être dû à une modification de la sensibilité d'ouverture d'un seul canal (canal à calcium ou canal à chlorures), laquelle serait plus fortes pour les voltages négatifs ; (2) Il pourrait aussi résulter de la somme de deux ou de plusieurs conductances membranaires (liées à la mise en jeu de plusieurs canaux), certaines s'activant suite aux premiers mouvements d'ions. Dans les expériences de voltage ramp présentées à la figure 10D, on constate que le remplacement du chlorure de calcium par la même concentration en gluconate de calcium dans la solution extracellulaire ne modifie pas la conductance membranaire induite par PrsS_{3/8} (les barres d'erreurs se recoupent). Le gluconate ne pouvant traverser la membrane, on en déduit que le courant entrant induit par PrsS_{3/8} est dû à un influx d'ions calcium dans la cellule. L'addition d'un agent bloquant des canaux calcium à large spectre (ions La³⁺) dans la solution extracellulaire supprime complètement le courant entrant induit par PrsS_{3/8}, démontrant que celui-ci met en jeu l'ouverture d'au moins un canal à calcium.

Enfin, la dernière question (question 15) demandait d'intégrer dans un schéma fonctionnel l'ensemble des réponses physiologiques survenant lors de l'interaction (incompatible) d'un pollen S₁ avec le pistil d'une plante S₁S₃. Seuls les candidats les plus persévérants ont abordé cette question correctement et ont récolté des points. Le schéma bilan devait faire apparaître l'expression de PrpS₁ au niveau de la membrane plasmique d'un pollen, la sécrétion de PrsS_{1/3} au niveau du stigmate, l'interaction PrsS₁-PrpS₁ au niveau de la membrane plasmique du tube pollinique, l'influx initial de calcium d'origine extracellulaire suite à l'ouverture d'un canal à calcium de la membrane plasmique, l'activation initiale d'une phospholipase C sensible à la concentration en calcium, la boucle d'amplification conduisant à la libération supplémentaire de calcium intracellulaire (voir question 9), la propagation de la vague calcique dans le tube pollinique et enfin les effets cellulaires obtenus (inhibition de la germination des grains de pollen et inhibition de la croissance du tube pollinique au niveau de l'apex).

Sujet B – Identification d'acteurs moléculaires de la fécondation chez la Souris

Ce deuxième sujet avait comme objectif de caractériser certains acteurs de l'étape de fusion des gamètes chez la Souris. Une protéine du gamète femelle (CD9) et deux protéines du gamète mâle (PSG17 et Izumo) étaient étudiées.

La première partie du devoir (questions 16 et 17) présentait des arguments en faveur d'un rôle potentiel de CD9 dans la fécondation. La question 16 évaluait les capacités d'observation des candidats. La description de la structure de

l'ovocyte a été réalisée par la plupart des candidats, mais en des termes souvent approximatifs ou non adéquats (voir remarque ci-dessus concernant le vocabulaire). Nous attirons l'attention des candidats sur la différence entre corrélation et causalité. Ces deux notions ne sont pas interchangeables : ici par exemple, il existait une corrélation entre la présence de CD9 et la fixation des spermatozoïdes ; il était cependant faux de dire que CD9 était nécessaire à la fixation des spermatozoïdes. En revanche, il était judicieux de formuler cette hypothèse, que la suite du devoir devait valider ou non. La question 17 a souvent été traitée de façon trop rapide, les candidats ne dégageant pas les points que la figure 12 apportait par rapport à la figure 11. En effet, si la figure 12 confirmait la présence de CD9 sur la zone microvillaire de l'ovocyte, elle permettait en outre de préciser que CD9 était présente préférentiellement sur les microvillosités et peu dans les régions membranaires planes situées entre les microvillosités. Une analyse quantitative était possible ici. Le rôle de l'expérience témoin (anticorps secondaire seul, démontrant la spécificité du marquage) n'a que rarement été explicité (voir remarque ci-dessus sur le traitement des expériences témoin). De cette première série d'observations, il fallait conclure que CD9 est exposée à la surface des microvillosités, ce qui était attendu pour un partenaire moléculaire des spermatozoïdes. Très peu de candidats ont utilisé la donnée de l'énoncé selon laquelle CD9 était une protéine transmembranaire.

La deuxième partie (questions 18 à 26) visait à démontrer que CD9 était nécessaire à l'étape de fusion des membranes de l'ovocyte II et du spermatozoïde. L'intégralité de cette partie reposait sur l'utilisation de souris dont un ou les deux allèles du gène codant CD9 avaient été invalidés (souris « knock-out »). La question 18 a été traitée de façon très inégale. Seule une minorité de candidats ont compris l'intérêt d'introduire un gène de résistance à un antibiotique (sélection positive des cellules dans le génome desquelles le transgène s'est intégré) ainsi qu'un gène suicide (élimination des cellules dans lesquelles le transgène s'est intégré de façon non homologue). Il est surprenant que le bon sens n'ait pas permis aux candidats de rectifier leur réponse quand leur raisonnement les poussait à tuer les souris d'intérêt afin de vérifier qu'elles avaient bien intégré le transgène ! Le calcul des tailles attendues pour les fragments d'ADN issus de la digestion de l'ADN génomique des différentes souris a été, là encore, inégal. Les erreurs provenaient essentiellement d'une lecture trop rapide de la figure 13, où il apparaissait que la sonde se fixait en 3' du transgène (voir remarque ci-dessus sur la lecture de l'énoncé). Notons ici également que l'interprétation des expériences témoin (*GAPDH* et actine) était souvent trop rapide. Nous déplorons que très peu de candidats ont conclu sur l'efficacité de l'invalidation, en notant le niveau d'expression de CD9 chez les souris hétérozygotes plus faible que chez les souris sauvages, ce que indiquait que l'invalidation n'était complètement effective sur le plan fonctionnel que chez les souris homozygotes *-/-*. Un point de vocabulaire ici : on dit qu'un allèle est dominant sur un autre, mais on ne dit pas qu'un gène est dominant.

La question 20 demandait de justifier l'utilisation du rapport F340/F380 pour la mesure de la concentration calcique intra-ovocytaire. Le fait que le rapport F340/F380 augmentait plus rapidement que la valeur F340 seule, ce qui augmentait la sensibilité de mesure, a été bien compris en général. La figure 14 montrait alors que l'incubation des ovocytes *CD9^{-/-}* avec des spermatozoïdes ne résultait en aucune variation de la concentration calcique intra-ovocytaire, contrairement aux ovocytes sauvages qui subissaient des oscillations calciques régulières. La majorité des candidats ont bien décrit ces différences et ont proposé à juste titre que CD9 était nécessaire à la vague calcique, mais l'interprétation en termes d'efficacité de la fécondation n'a presque jamais été proposée. En effet, très peu de candidats ont compris que ce signal calcique témoignait de l'activation métabolique de l'ovocyte suite à la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte (alors que ce point était en général mentionné dans la synthèse). En conséquence, très peu de candidats ont pu suggérer que les étapes de la fécondation jusqu'à la fusion étaient effectives dans les ovocytes *+/+* mais ne l'étaient pas dans les ovocytes *-/-*.

La question 22 demandait de schématiser le devenir du matériel génétique mâle et femelle au cours de la fécondation, en vue de faciliter l'analyse de la figure 15A. La réalisation de ce schéma a été inégale, avec certains schémas très peu soignés et comportant des imprécisions voire des erreurs (nombres de chromosomes homologues et de chromatides à chaque étape par exemple). La figure 15A présentait alors le suivi de la fusion par l'utilisation de DAPI injecté dans le cytosol des ovocytes. Il fallait comprendre ici qu'en absence de toute fusion, seul le matériel génétique de l'ovocyte était marqué, tandis qu'en cas de fusion, le DAPI marquait à la fois le matériel génétique femelle et mâle. Il fallait également avoir en tête qu'en cas de fusion, le matériel génétique femelle poursuivait la méiose et était séparé en deux lots de chromatides décondensées (anaphase de seconde division). On pouvait donc conclure des photographies que dans le cas de l'ovocyte sauvage, la fusion entre un spermatozoïde et l'ovocyte avait eu lieu. Dans le cas de l'ovocyte *-/-*, aucune fusion n'avait eu lieu. Certains candidats ont interprété à tort les trois structures marquées dans le cas de l'ovocyte sauvage comme le génome de l'ovocyte et celui de deux spermatozoïdes. Assez peu de candidats ont interprété cette figure en termes d'efficacité de la fusion spécifiquement, en argumentant que l'adhérence des spermatozoïdes n'était pas affectée par l'absence de CD9. La plupart des candidats connaissaient globalement la définition d'un ARN polyadénylé. Cependant, on peut déplorer le manque de précision des réponses (la position en 3' de l'ARN n'apparaissait que très rarement dans les copies par exemple). L'intérêt de l'expérience consistant à injecter des ARN messagers codant CD9 n'est pas toujours apparu clairement et la figure 16 a souvent été interprétée comme une confirmation de la figure 15. Cependant, les résultats indiquaient que le défaut dans la fécondation des ovocytes *CD9^{-/-}* pouvait être complété par l'expression de CD9. Cette observation était importante car elle montrait que le défaut de fécondation était bien dû au défaut d'expression de CD9 et non à une conséquence indirecte de l'invalidation

de CD9 dont on aurait vu ici l'effet.

La dernière partie du devoir (questions 27 à 29) explorait trois pistes de mécanisme d'action de CD9 dans la fusion des gamètes. La première piste (question 27) faisait appel à des données structurales : on observait les altérations de la structure microvillaire de l'ovocyte induites par l'inactivation de CD9 (microvillosités plus larges et moins longues en l'absence de CD9). Cette question a été traitée par la plupart des candidats, même si très peu d'entre eux ont proposé une analyse rigoureuse et quantitative des photographies. Certains candidats ont confondu microvillosités et protéines, ce qui indique qu'ils n'ont pas tenu compte des barres d'échelle ! (voir commentaire ci-dessus) Il est dommage que très peu de candidats ayant décrit ces altérations structurales aient fait le lien avec les défauts de fusion analysés plus haut en proposant que l'absence de CD9 induisait une topographie locale de la membrane de l'ovocyte incompatible avec une fusion des membranes. Ceci témoigne d'un manque de recul des candidats vis-à-vis des expériences proposées et d'un effort de synthèse insuffisant. Indiquons ici que les candidats proposant une analyse intégrée et critique de l'ensemble du devoir, plutôt qu'une analyse « figure par figure », ont été très valorisés.

La deuxième piste (question 28) reposait sur des données de mécanique : on mesurait les forces d'interaction entre un spermatozoïde et un ovocyte sauvage ou CD9^{-/-}. Le système expérimental faisait appel à des notions de mécanique des solides (force de tension exercée sur un ressort). La plupart des candidats ont bien su faire appel à leurs connaissances de physique pour s'approprier le système expérimental. Cependant, l'analyse des résultats obtenus était décevante, lorsqu'elle était réalisée. Pour des ovocytes +/+, Frupt suivait une distribution bimodale avec un premier pic centré sur 10pN et un deuxième pic centré sur 22pN. Cela signifiait que lors d'un contact spermatozoïde – ovocyte, deux types d'interactions pouvaient être mis en place : soit une interaction faible (correspondant au premier pic), soit une interaction forte (correspondant au deuxième pic). Pour des ovocytes -/-, Frupt suivait une distribution unimodale avec un pic centré sur 12pN : un seul type d'interaction, l'interaction faible, était mis en place. Il fallait donc conclure que l'absence de CD9 n'empêchait pas les spermatozoïdes d'adhérer à l'ovocyte, mais empêchait la mise en place d'interactions fortes entre spermatozoïdes et ovocyte. D'après les résultats des expériences précédentes, on pouvait donc faire l'hypothèse qu'une interaction forte entre spermatozoïdes et ovocyte, dépendante de CD9, pourrait être un prérequis à la fusion des membranes. Encore une fois, le lien entre l'analyse de la figure et la question posée par l'ensemble de l'exercice n'est apparu que dans un nombre très réduit de copies. Un certain nombre de candidats s'est arrêté à ce point du devoir, par manque de temps probablement.

La question 29 était une question originale, évaluant la capacité des candidats à synthétiser et comparer les résultats provenant de plusieurs expériences. On demandait aux candidats de présenter sous forme de tableau les conclusions de l'analyse des figures 19 et 20. Les candidats ayant traité cette question ont souvent produit un tableau bien construit, mais les informations portées dans le tableau étaient très largement incomplètes ou imprécises. Par exemple, la plupart des candidats ont noté que CD9 interagissait avec PSG17 d'après la figure 19. Cependant, on pouvait conclure de façon plus précise que CD9 interagissait directement et sélectivement avec PSG17 *in vitro* et que CD9 était nécessaire à la fixation de PSG17 à la surface de l'ovocyte. De la même façon, de nombreux candidats ont fait apparaître qu'Izumo était exprimé par les spermatozoïdes et nécessaire à la fécondation. Cependant, la figure 20 montrait plus précisément qu'Izumo était exprimé par les spermatozoïdes ayant subi la réaction acrosomique (ce qui était en accord avec un rôle d'Izumo dans la fécondation au sens strict) et était nécessaire à l'étape de fusion spécifiquement. La figure 19C a très souvent été mal interprétée. En effet, elle montrait que l'incubation des ovocytes en présence d'un excès de PSG17 purifiée réduisait la capacité des spermatozoïdes d'adhérer et/ou de fusionner avec les ovocytes. Ces résultats pouvaient être interprétés par un mécanisme compétitif dans lequel l'excès de PSG17 purifiée bloquerait l'interaction de CD9 avec un ligand porté par le spermatozoïde, et indiqueraient alors que l'interaction CD9 / ligand serait nécessaire à la l'adhérence et/ou à la fusion cellulaires.

On demandait ensuite aux candidats d'argumenter quant à l'implication potentielle de PSG17 et d'Izumo dans la fécondation. On attendait ici les éléments suivants :

- PSG17 était un candidat de ligand de CD9. Toutefois, il restait à démontrer qu'il s'exprimait effectivement à la surface du spermatozoïde et que son interaction avec CD9 était effectivement impliquée dans la fusion, ce que les données de l'exercice ne validaient pas.
- Étant donné qu'Izumo s'exprimait à la surface des spermatozoïdes et qu'il était nécessaire dans la fusion du spermatozoïde avec l'ovule, on pouvait proposer qu'Izumo était un meilleur candidat que PSG17. Cependant, pour le confirmer, l'interaction directe d'Izumo avec CD9 devait être démontrée.

Enfin, la dernière question (question 30) demandait d'intégrer dans un schéma de synthèse l'ensemble des conclusions tirées de l'exercice. Très peu de candidats ont fait l'effort de reprendre l'intégralité des résultats de l'exercice, pour ne traiter que de la dernière figure. Les copies présentant un bilan global ont été valorisées. Les points suivants pouvaient apparaître sur le schéma : le rôle de CD9 dans l'architecture microvillaire (on pouvait faire apparaître l'hypothèse selon laquelle CD9 exercerait un rôle direct de protéine d'ancrage du cytosquelette d'actine ou un rôle indirect par l'interaction avec des protéines d'ancrage du cytosquelette) ; le lien (à confirmer) entre architecture microvillaire et fusion des membranes ; le rôle de CD9 dans la mise en place d'interactions fortes avec les spermatozoïdes (hypothèses : effet direct par l'interaction avec un ligand présent à la surface du spermatozoïde ou indirect par le contrôle de

l'architecture membranaire) ; le lien (à confirmer) entre la mise en place d'interactions fortes et la fusion et le rôle de CD9 dans l'interaction avec un ligand présent à la surface du spermatozoïde nécessaire à la fusion (les candidats étant Izumo et PSG17).